

Aus der Forschungsabteilung für Elektronenmikroskopie
der Freien Universität Berlin

Leiter: Professor Dr. med. W. Schwarz

ELEKTRONENMIKROSKOPISCHER NACHWEIS
DER SAUREN PHOSPHATASE IN DEN SIDEROSOMEN
DER MAKROPHAGEN DER RATTENMILZ

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Siegfried Spors
aus Liegnitz

1967

Aus der Forschungsabteilung für Elektronenmikroskopie
der Freien Universität Berlin

Leiter: Professor Dr. med. W. S c h w a r z

Elektronenmikroskopischer Nachweis
der sauren Phosphatase in den Siderosomen der Makrophagen
der Rattenmilz

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
SIEGFRIED SPORS
aus Liegnitz

Dekan: Professor Dr. med. Alfred N. Witt
Referent: Professor Dr. med. Willy Schwarz
Korreferent: Professor Dr. med. Wilhelm Maßhoff



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Freien Universität Berlin

Promoviert am: 6. Juli 1967

Einleitung: 1. Die Bedeutung von Qualität im Unternehmen
2. Ziele und Aufgaben des Qualitätsmanagements
3. Die Rolle der Mitarbeiter im Qualitätsmanagement

II. Die Grundlagen des Qualitätsmanagements

1. Die Bedeutung von Qualität für das Unternehmen

2. Die Grundlagen des Qualitätsmanagements: Die ISO 9000 Normen und die TQM-Philosophie

III. Die Umsetzung des Qualitätsmanagements

1. Die Umsetzung des Qualitätsmanagements in der Praxis

2. Die Umsetzung des Qualitätsmanagements in der Praxis

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

Die folgenden Kapitel behandeln die Grundlagen des Qualitätsmanagements und die Umsetzung des Qualitätsmanagements in der Praxis. Die Kapitel sind in drei Teile gegliedert: I. Die Bedeutung von Qualität im Unternehmen, II. Die Grundlagen des Qualitätsmanagements und III. Die Umsetzung des Qualitätsmanagements.

Die folgenden Kapitel behandeln die Grundlagen des Qualitätsmanagements und die Umsetzung des Qualitätsmanagements in der Praxis.

Die folgenden Kapitel behandeln die Grundlagen des Qualitätsmanagements und die Umsetzung des Qualitätsmanagements in der Praxis.

Die folgenden Kapitel behandeln die Grundlagen des Qualitätsmanagements und die Umsetzung des Qualitätsmanagements in der Praxis.

III

Inhaltsverzeichnis

- Einleitung : I Die zelluläre Aufnahme von Substanzen
(Endocytose) und deren Abbau durch En-
zyme; Funktion der Lysosomen
- II Der ultramikroskopische Nachweis der Lysosomen
- 1) Lokalisation der Enzyme - die saure Phosphatase
 - 2) Erhaltung der Gewebefeinstruktur - die Glutaraldehyd-Osmiumtetroxyd-Doppel-fixierung
- III Der Abbau der roten Blutkörperchen
- 1) Zerstörung des Hämoglobins in den Siderosomen
- IV Die Problemstellung: Sind lysosomale Enzyme beim Abbau des Hämoglobins beteiligt?

Material und Methode: Histochemische Lokalisation der sauren Phosphatase in der Milz und in anderen Organen der Ratte, sowie ihre Abgrenzung gegen eine weitere unspezifische Phosphatase mit alkalischem p_H -Optimum

- I Vorfixation in 3 % Glutaraldehyd, Cacodylatpuffer p_H 7,2
- II Waschen des Gewebes 1) in 0,1 M Cacodylatpuffer p_H 7,2 2) anschließend in 0,05 M Acetatpuffer p_H 6,8
- III Gefrierschneiden im Cryostaten, Schnittstärke 40 μ

IV Inkubation der Schnitte in einem Medium nach GOMORI (1952) bei 37°C, Zusammensetzung:

100 ml 0,05 M Acetatpuffer (p_H 5,0 bis 7,9)
0,12 g Bleinitrat
10 ml 3 % Na- β -Glycerophosphat
7,5 g Saccharose

V Waschen der Schnitte in 0,05 M Acetatpuffer

VI Nachfixierung in 2 % OsO_4 , Veronalacetatpuffer p_H 7,2

VII Entwässerung in der Acetonreihe, Vestopal-einbettung

Befunde: I Die Feinstruktur nach histochemischer Präparation des Gewebes

II Die Spezifität der durchgeführten enzymatischen Reaktion

- 1) für die saure Phosphatase
- 2) für die alkalische Phosphatase

III Die Verbreitung der sauren Phosphatase in einzelnen Organen

IV Das enzymatische Reaktionsprodukt in der Milz und seine Verteilung

V Die Milzmakrophagen; Charakterisierung der im Cytoplasma gelegenen Strukturen

- 1) als Erythrocytenanteile, aufgrund der Dichte des Materials
- 2) als Siderosomen, gemäß ihres Gehaltes an Ferritinpartikeln
- 3) als Lysosomen, gemäß ihres Gehaltes an Reaktionsprodukt der sauren Phosphatase

VI Die Siderosomen enthalten Enzymaktivität der sauren Phosphatase in hohem Maße

Diskussion:

I Der Abbau des Hämoglobins

- 1) Zerstörung der Erythrocyten, intravasal - intrazellulär
- 2) Vergleich der Siderosomen in den Milzmakrophagen mit ferritinhaltigen Strukturen anderer Organe, in denen sich nach Applikation von Hämoglobin eine Lyse des Blutfarbstoffes vollzieht.
- 3) Die Endstadien der Hämolyse in den Milzmakrophagen; Siderosomen enthalten saure Phosphatase, sie stellen eine besondere Gruppe der Lysosomen dar.
- 4) Die Wirkung des lysosomalen Cathepsins auf den Blutfarbstoff
- 5) Die Verteilungsmuster des Cathepsins und der sauren Phosphatase in den Lysosomen.

II Die Synthese, Speicherung und Abgabe der lysosomalen Enzyme an die endocytotische Vakuole; die Bedeutung des Golgi-Apparates in diesem Zusammenhang

III Die eisenhaltigen Produkte des Hämoglobinabbaues: Ferritin und Siderin

IV Der Abbau des Blutfarbstoffes in der Milz und in den übrigen Organen

V Die Bedeutung der Lysosomen im Organismus

Zusammenfassung

Literatur-Verzeichnis

Abbildungen

Lebenslauf

Einleitung

Endocytose und Funktion der Lysosomen

Das Leben der Zellen äußert sich in einer Reihe sinnvoll koordinierter Vorgänge - Lebenserscheinungen wie Stoff- und Energiewechsel, Wachstum, Zellteilung, Bewegungen, Erregbarkeit. Mit fortschreitender Differenzierung weisen die Zellen entsprechend ihrer unterschiedlichen Funktionen spezifische Strukturen auf; man denke an die Myofibrillen der Muskelzellen, an den Bürstensaum des Dünndarmes und des Hauptstückes im Nephron oder an das reichlich ausgebildete endoplasmatische Retikulum (Ergastoplasma) in sekretorisch aktiven Zellen, wie beispielsweise in der Prostata und in den serösen Pankreaszellen oder im Spongiotrophoblasten der Rattenplacenta.

Stoffwechselleistungen zur Erhaltung des Energiepotentials werden von allen lebenden Zellen vollbracht, die bekanntlich in einem ständigen Austausch mit ihrer Umgebung stehen. Den Mechanismus der zellulären Stoffaufnahme bezeichnet man als Endocytose. Bei diesem Vorgang entstehen nach Adsorption des exogenen Materials an die Zellmembran mehr oder weniger tief in das periphere Cytoplasma vordringende Einstülpungen, von denen sich Vesikeln und Vakuolen ab schnüren. Gleichgültig, ob eine pinocytotische Aufnahme ultramikroskopischer Teilchen vorliegt, deren Durchmesser kleiner gleich $1000 \text{ \AA}$ ist, oder ob größere Bestandteile, Zellbruchstücke und intakte Zellen phagocytiert werden, durch die Endocytose gelangt das fremde Material völlig von einer Membran umgeben in das Cytoplasma und ist somit von ihm während des Abbauprozesses abgesondert.

Die weitere chemische Aufschließung der Produkte innerhalb der Zelle ist nur möglich durch die Anwesenheit verschiedener Katalysatoren, die man in der Biochemie als Fermente oder Enzyme benennt. Die Wirkung der Enzyme besteht darin,

daß sie ein Fließgleichgewicht (steady state) in der Kette der chemischen Reaktionen erhalten, und zwar indem sie die Moleküle in einen reaktionsbereiten Zustand bringen. Eine zentrale Bedeutung für den Abbau haben unter den Enzymen besonders die sauren Hydrolasen, die sich in cytoplasmatischen Einschlüssen lokalisieren. Diese Zelleinschlüsse wurden erstmalig von de DUVE (1955) durch Zentrifugation von der Mitochondrienfraktion getrennt. De DUVE wählte für die isolierten cytoplasmatischen Körper in Beschreibung ihrer Funktion den Namen Lysosom und vermutete in ihnen eine weitere Zellorganellgruppe. Bisher sind in den Lysosomenfraktionen dreizehn verschiedene Enzyme nachgewiesen worden, die Proteine, Mucopolysaccharide, Kohlenhydrate, Lipide und Nucleinsäuren hydrolytisch spalten können und ihr Wirkungsoptimum im sauren Bereich haben:

Phosphorproteinphosphatase, Cathepsin, Collagenase, β -Glucuronidase, β -Galactosidase, β -N-Acetylglucosaminidase, α -Mannosidase, Arylsulphatase, α -1-4-Glucosidase, saure Lipase, saure Ribonuclease, saure Desoxyribonuclease und saure Phosphatase.

Eine deutliche Beziehung zwischen phagocytiertem Material und den Lysosomen wurde von STRAUSS (1962/64) in der Niere beschrieben. LOCKWOOD (1963) und ZUCKER-FRANKLIN (1964) schließen nach ihren Befunden an Granulocyten ähnlich wie STRAUSS auf eine Fusion der endocytotischen Vakuole mit dem Lysosom. Auch DAEMS (1962) interpretiert die Dichteänderung der Matrix der Leberlysosomen nach Dextran- und Eisendextrangabe in gleicher Weise. Man versuchte, die einzelnen Stadien zur Entstehung der sog. Phago-Lysosomen zu differenzieren, ausgehend von der de DUVE'schen Definition einer Vakuole als Lysosom aufgrund des Inhalts an sauren Hydrolasen und der Begrenzung durch eine einfache Membran (unit membrane). Von primären Lysosomen spricht man, solange der Enzymaktivität in dem Einschluß nicht deutlich abbaufähiges Material

benachbart ist, und von sekundären Lysosomen, wenn die sauren Hydrolasen von ihren Substraten umgeben sind. Die sekundären Lysosomen unterteilt man weiter, je nachdem, ob die zu verdauenden Substanzen exogener oder körpereigener Art sind (hetero- bzw. autophagische Vakuolen). Ferner rechnet man zu den sekundären die sog. "residual bodies"; diese Zelleinschlüsse haben lamellenartig Lipidreste eingelagert, wahrscheinlich aber erst nach längerer Funktion infolge ihrer geringeren lipolytischen Aktivität.

Die Synthese der Enzyme, zumindest ihres Eiweißanteiles (Apoenzym), erfolgt an den Ribosomen, dem Organell, das die im Zellkern produzierten Messenger-Ribonucleinsäure beherbergt. An welchen Strukturen der Zelle das Apoenzym mit seiner prosthetischen Gruppe (Coenzym) gekoppelt wird, ist nicht geklärt.

Nachweis der Lysosomen

Morphologisch kann man die Lysosomen bisher nur durch den Nachweis der sauren Phosphatase in Vakuolen und Vesikeln lichtmikroskopisch (GOMORI 1952, BURNSTONE 1962) und elektronenmikroskopisch (HOLT 1961, ESSNER 1961, MILLER 1962/64, NOVIKOFF 62/64) identifizieren. Bei der Deutung dieser Befunde geht man von der Tatsache aus, daß die saure Phosphatase mit anderen sauren Hydrolasen vergesellschaftet ist, was für die Lysosomen der Niere (STRAUSS 1956), der Leber (de DUVE 1959), der Mucosa des Dünndarmes (LICHU 1964), der Alveolarmakrophagen (COHN 1963) und der neutrophilen und eosinophilen Granulocyten (COHN 1960, ARCHER 1963) nachgewiesen werden konnte.

Für die Ultramikroskopie muß in allen enzymatischen Reaktionen ein unlösliches Schwermetallsalz gefällt werden. Eine Substratspezifität liegt z.B. bei der Glucose-6-Phosphatase vor, aber nicht für alle übrigen Phosphatasen. So bevorzugt man zwar für die saure Phosphatase das Natrium-beta-Glycerophosphat, doch sind unter einer Reihe weiterer

Substrate die Phosphatester Phenyl- und p-Nitrophenylphosphat, die Monophosphate von Brenzkatechin, Resorcin und Hydrochinon (GOMORI 1941/52) sowie für die Diazo-Farbstoffmethode Naphtholphosphate zu nennen (BARKA, ANDERSON 1962). Die Bleisalze der Phenylphosphate, des Brenzkatechin- und Resorcinmonophosphates sind sehr schwer löslich, so daß sie in der Histochemie verwendet werden können. Das Hydrochinon hingegen ist als Substrat weniger geeignet (GOMORI 1950).

Zur elektronenoptischen Lokalisation der Enzyme war es nötig, neue Fixationsmethoden zu entwickeln, weil unter der vorwiegend angewandten Osmiumtetroxydfixierung eine fast vollständige Inaktivierung eintrat und eine Inkubation bei 37°C ohne vorherige Fixierung des Gewebes die zelluläre Feinstruktur zerstörte (HOLT, HICKS 1962).

Die histochemische Bedeutung des Glutaraldehyds

In der Reihe der Aldehyde (Formaldehyd, Acetaldehyd, Glycolaldehyd, Acrolein, Pyruvataldehyd, Crotonaldehyd, Malonaldehyd, Succinaldehyd, Hydroxyadipaldehyd) hat nur das Glutaraldehyd eine Bedeutung für die Histochemie (SABATINI 1963/64). Dieses Dialdehyd übertrifft in der Gewebserhaltung das kleinstmolekulare Formalin durch seine Fähigkeit, zwischen den Hydroxy- und Aminogruppen der Proteine Brücken zu bilden. Mit dem Hydroxyadipaldehyd können zwar im Gegensatz zum Glutaraldehyd selbst labilere Enzyme wie die Glucose-6-Phosphatase nachgewiesen werden, doch ist die Diffusionsgeschwindigkeit sehr gering und damit auch die Strukturserhaltung.

Nach Glutaraldehydfixation ist zu berücksichtigen, daß, wie MILLER (1964) am Beispiel der renalen sauren Phosphatase zeigte (6,25 % Glutaraldehyd, 1-3 Std.), immerhin noch bis zu 50 % der Enzymaktivität gehemmt wird. Die feineren Strukturen der Zelle sind nach dieser Aldehydfixierung nur angedeutet, durch eine 1 bis 2%ige Osmium-

tetroxyd-Nachfixierung erhöht sich der Kontrast, doch zeigen sich Abweichungen von der ausschließlich mit OsO_4 durchgeführten Fixation, die zum Teil in der Eigenschaft der Aldehyde liegen, Zellipide zu lösen und Proteine besser zu stabilisieren (SABATINI 1963/64).

Abbau der roten Blutkörperchen; die Zerstörung ihres Hämoglobins in den Siderosomen.

Die ständige Erneuerung der Bestandteile des strömenden Blutes wurde schon in früheren Jahrhunderten festgestellt. Doch bis in die heutige Zeit blieb es im einzelnen ungeklärt, auf welche Weise und wo der Abbau erfolgt. PREYER beschrieb 1864 das Phänomen der Erythrophagocytose, LEPEHNE (1919) wies einen intrazellulären Abbau bei schweren Infekten nach (z.B. unter der Weil'schen Krankheit). Mit dem Auffinden eines phagocytotisch recht aktiven Zellverbandes, dem retikuloendothelialen System (ASCHOFF 1924), sah man den Abbauprozess der Erythrocyten als Leistung jener aktiven Zellen an. Dieses entspricht jedoch nicht den tatsächlichen Verhältnissen, denn nach den Untersuchungen von MASSHOFF (1954) überwiegt die intravasale (humorale) Zerstörung der roten Blutkörperchen. Eine Phagocytose intakter Erythrocyten konnten auch BLOOM (1962) und MOORE (1964) nur äußerst selten beobachten. Als Lebensdauer der menschlichen roten Blutkörperchen werden aufgrund der Markierungsversuche mit radioaktiven Isotopen (CLINE 1963) 100 bis 120 Tage angenommen. Besonders zu erwähnen sind hier die Bestimmungen mit Glycin nach Kennzeichnung durch ^{15}N - oder ^{14}C -Atome. Täglich müssen im Knochenmark also 0,9 bis 1 % des Bestandes ersetzt werden, d.h. 200 bis 250 Milliarden neue Erythrocyten gebildet werden. Die Zerstörung des Hämoglobins der überalterten roten Blutkörper, deren Zerfall im strömenden Blut beobachtet wurde (MASSHOFF 1950/54), erfolgt durch die Zellen des retikuloendothelialen Systems.

Hier - in dem Knochenmark, der Leber, den Lymphknoten und vor allen in der Milz - werden Erythrocytenfragmente aufgenommen und abgebaut (BESSIS 1961). Dabei zerfällt das Hämoglobin in eine eisenhaltige und eine pyrrolhaltige Komponente. Das Eisen wird bei der Neubildung der Erythrocyten im Knochenmark wieder verwendet, der pyrrolhaltige Gallenfarbstoff mit Glucuronsäure konjugiert und ausgeschieden. Gespeichert liegt das Eisen als Ferritin oder bei gesteigertem Blutkörperchenzerfall als Siderin vor; bei reichlicher Siderineinlagerung erhält das Gewebe eine rostbraune Farbe (Siderose).

In den Histiocyten der Milz wurden Erythrocytenbruchstücke und eisenhaltiges Pigment von verschiedenen Autoren beschrieben: LAUDA (1933), v.HERRATH (1935/58), PALADE (1956), STOECKENIUS (1957/59), HEILMEYER u. BEGEMANN (1961), WINTROBE (1962), MOORE (1964), ROBERTS (1964). Die Aufnahme dieser Substanzen und ihre intrazelluläre Verdauung hat man erst mit der Auflösung des Elektronenmikroskopes genauer untersuchen können. Als Endprodukte erscheinen feine, dichte eisenhaltige Granula in membranbegrenzten Zelleinschlüssen, die nach RICHTER (1957/59) als *S i d e r o s o m e n* bezeichnet werden. Umfassende histologische Arbeiten über den Abbau der Erythrocyten und ihrer Bruchstücke liegen bisher nicht vor. Die histochemische Lokalisation der erforderlichen Enzyme im elektronenoptischen Bereich fehlt völlig. Damit bleibt auch die Frage offen, ob bei diesen Abbauprozessen lysosomale Enzyme beteiligt sind. Im Hinblick auf die Breite des Enzymspektrums der Lysosomen können wir eine derartige Funktion vermuten.

Eine hohe saure Phosphataseaktivität in den retikuloendothelialen Zellen der Leber (v.Kupffer'schen Sternzellen) ist bekannt (NOVIKOFF 1961/64, DAEMS 1962). Auch in den Lymphknoten und in der Milz haben DAVIES (1934) und MEIJER (1961) in Homogenaten und BARKA (1961) lichtmikroskopisch in den Histiocyten saure Phosphatase nachgewiesen. Unter

der Einwirkung des Cathepsins beobachtete ANSON (1936) in vitro eine Hämolyse, also durch ein Enzym, das zu den lysosomalen Hydrolasen gerechnet wird.

In der vorliegenden Arbeit soll elektronenmikroskopisch die Bedeutung der Lysosomen beim physiologischen Abbau der roten Blutkörperchen in der Rattenmilz untersucht werden. Die Darstellung der Lysosomen erfolgt durch den Nachweis der sauren Phosphatase, die nach de DUVE (1964) und NOVIKOFF (1964) als typisch in den Lysosomen gelegen und als verlässliches Kennzeichen der Lysosomen betrachtet wird. Dazu wird die histochemische Methode für die saure Phosphatase nach GOMORI (1952) angewandt. Hierbei entsteht nach enzymatischer Hydrolyse eines Phosphatesters in Gegenwart von Bleitionen ein Bleiphosphatniederschlag.

Material und Methode

Die Untersuchungen wurden an durchschnittlich 200 g schweren Albinoratten durchgeführt. Die Tiere erhielten ein standardisiertes Trockenfutter und Wasser ad libitum. Unter leichter Ätheranästhesie wurde die Milz entnommen und in der Fixierflüssigkeit bei etwa 4°C in 1 bis 2 mm dicke Scheiben querschnitten.

Die Fixierung erfolgte in 3 %igem Glutaraldehyd, gepuffert mit 0,1 M Na-Cacodylat (End-p_H 7,2) vier Stunden lang bei 0 bis 2°C. Anschließend wurde das Präparat in 0,1 M Cacodylatpuffer (p_H 7,2) und 0,05 M Acetatpuffer (p_H 6,8) jeweils zwei Minuten gewaschen. Beide-Puffer enthielten 7,5 % Saccharose und waren auf 0 bis 2°C temperiert.

Das Gefrierschneiden des fixierten Materials wurde im Cryostaten durchgeführt. Die Schnittdicke betrug 40 µ. Das Gewebe wurde in 0,05 M Acetatpuffer (p_H 6,8) eingefroren und in der gleichen Lösung aufgefangen.

Die Inkubation der 40 µ dicken Schnitte erfolgte in einem Medium, modifiziert nach GOMORI (1952), bei 37°C mit einer Dauer von 10 Minuten (5' - 60'). Das Medium enthielt:

0,05 M Acetatpuffer (p_H 5,0 bis p_H 7,9)

0,00329 M Pb(NO₃)₂

0,0089 M Na-β-Glycerophosphat

0,22 M Saccharose (7,5 %)

Das Substrat, Natrium-beta-Glycerophosphat, wurde als 3 % Lösung zuletzt hinzugegeben. Das Medium war jeweils 45 Minuten vor Gebrauch hergestellt und bei 37°C vorgewärmt worden, da sich innerhalb dieses Zeitraumes eine leichte Trübung als Niederschlag völlig abgesetzt hatte, der abfiltriert wurde. Bevor die Gefrierschnitte in die Inkubationslösung gelangten, wurden sie kurz (30" - 60") in 0,05 M Acetatpuffer beim p_H-Wert des Mediums gewaschen. Bei den Kontrollen fehlte im Medium das Substrat oder es war 0,01 M NaF zugesetzt. Die

Wasserstoffionenkonzentrationen wurden bei Haupt- und Leerwerten kurz vor und nach der Inkubation geprüft. Das Gewebe wurde aus dem Medium in einen 0,05 M Acetatpuffer gebracht, dessen p_H -Wert der Inkubationslösung entsprach; dann wurde diese Waschlösung ausgetauscht gegen Acetatpuffer p_H 6,0 und 7,4 und schließlich gegen einen Veronal-Acetatpuffer p_H 7,4. Diese Puffer enthielten 7,5 % Saccharose und hatten eine Temperatur von etwa 4°C.

Die Nachfixierung erfolgte in 2 % Osmiumtetroxyd, gepuffert in Veronal-Acetat p_H 7,4, mit 0,22 M Saccharosezusatz eine Stunde lang. Auswaschen des Fixiermittels mit Pufferlösung (15' Dauer) und Entwässerung über die Acetonreihe in aufsteigenden Konzentrationen: 30%, 50%, 75%, 90%, 100%; Verweildauer je 15'. Das 100 %ige Aceton wurde zweimal gewechselt. Anschließend erfolgte die Einbettung in Vestopal W (KURTZ 1961). Die Dünnschnitt-Schnitte (500 Å) wurden mit Glasmessern am Porter-Blum-Mikrotom hergestellt und in 20 % Alkohol aufgefangen. Blenden: Kupfernetze mit einer Formvar-Befilmung; Kontrastierungen: 5 % Uranylacetat 20' - 40' (WATSON 1958), Bleihydroxyd 5' - 10' (WATSON 58, DALTON 1960, REYNOLDS 1963), und Doppelkontrastierung: Uranylacetat - Bleiacetat. Aufnahmen: Siemens Elmiskop I, bei einer Strahlspannung von 80 kV, Kondensor- und Objektaperturblendenöffnung 200/50 μ .

Der Transport der 40 μ dicken Schnitte innerhalb des Experimentes von Lösung zu Lösung wurden in geeigneten V 2A - Körben vorgenommen. Gleiche Untersuchungen wurden zusätzlich zur Kontrolle an weiteren Geweben durchgeführt, vor allem zur Abgrenzung des Reaktionsproduktes (Bleiphosphat) der sauren Phosphatase gegen das Produkt einer anderen unspezifischen Phosphatase mit einem p_H -Optimum im alkalischen Bereich.

Befunde

=====

Prüfung der Feinstruktur in der Zelle nach histo- chemischer Präparation

Eine Anzahl verschiedener Gewebe wurde nach vierstündiger Vorfixierung mit 3 %igem Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer, bei einem End- p_H von 7,2, in einem Medium nach GOMORI (1952) bei 37°C inkubiert und mit Osmiumtetroxyd nachfixiert. Die Erhaltung der Feinstruktur und der Enzymaktivität war ausreichend in Übereinstimmung mit den Ergebnissen nach einer ähnlichen Methode von SABATINI (1963/64) und von MILLER (1964). Gewebliche Schädigungen beruhten weniger auf der Glutaraldehydfixation als auf den Auswirkungen des Gefrieraktes im Cryostaten. Sie traten vermehrt auf, wenn die Gewebsschnitte eine Dicke von 3 bis 4 mm überschritten, selbst bei verlängerter Vorfixation (8 Stunden) mit 6 %igem Glutaraldehyd. Derartige Glutaraldehydkonzentrationen sind stark hyperton und beeinträchtigen besonders die Strukturen der äußeren Zellagen. Vakuolen und interzelluläre Räume waren in diesen Abschnitten dilatiert und häufig fand man hier rupturierte Membranen. Außerdem zeigten sich unregelmäßige, leere Gebiete ohne Strukturbeziehung als Zerstörungen des Cyto- und Caryoplasmas durch Kristallbildungen bei der Einfrierung. Im Gegensatz zu früheren Berichten von HOLT, HICKS (1961) und BARNETT (1962) ergab sich keine Abhängigkeit einer Gewebeschädigung vom niedrigen p_H der Inkubationslösung (p_H 5).

Spezifität der durchgeführten enzymatischen Reaktion, für die saure Phosphatase, für die alkalische Phosphatase.

Das p_H -Optimum der sauren Phosphatase liegt bei 5, doch wird das gleiche Substrat, hier das Na- β -Glycerophosphat,

ebenfalls von einer Phosphatase mit alkalischem p_H -Optimum (p_H 9) hydrolysiert. Das Reaktionsprodukt dieses Enzymes wurde mit der angegebenen Methode bei p_H 7,9 an solchen Strukturen lokalisiert, die dafür bekannt sind, daß sie alkalische Phosphatase enthalten, wie z.B. an dem Bürstensaum des Dünndarmes (Abb. 13 B) und des proximalen Tubulus des Nephron (Abb. 12 B/C) oder in den dichten Vakuolen der neutrophilen Granulocyten (Abb. 13 A) sowie im Endothel der Blutgefäße in der Prostata. Es konnte gezeigt werden, daß diese "alkalische" Phosphatase selbst bei p_H -Werten von 6,0 bis 5,3 reagiert; doch bei diesen Wasserstoffionenkonzentrationen kam ein erheblich schwächerer Niederschlag an den Mikrovilli des Nierenhauptstückes und in den Vakuolen der neutrophilen Granulocyten zustande. Auch für die saure Phosphatase ließ sich in den Zelleinschlüssen noch bei p_H 6 bis p_H 7 eine Aktivität in der Niere (Abb. 12 B), Schilddrüse (Abb. 14 A), Nebennierenrinde und im Drüsenepithel der Prostata nachweisen. Deshalb wurden die Schnitte, die in der Serie benachbart waren, bei drei bis vier verschiedenen p_H -Werten (p_H 5,0 bis p_H 7,9) gleichzeitig inkubiert.

Verbreitung der sauren Phosphatase in den einzelnen Organen

In der Leber wurden enzymhaltige dichte Zelleinschlüsse besonders reichlich in der Umgebung von Gallenkapillaren als sog. peribiläre Körper (Lysosomen) identifiziert. In der Niere lassen sich im Hauptstückepithel wie auch in anderen Teilen des Nephron saure phosphatasehaltige Vakuolen darstellen (Abb. 12 A). Ihre Zahl nimmt während der Aminonucleosid-Nephrose zu. In sezernierenden Zellen, z.B. des Drüsenepithels der Prostata (Abb. 15 C) oder im exokrinen Anteil des Pankreas (Abb. 15 B), ist die saure Phosphatase in den gleichen Zellorganellen anzutreffen. Eine Unterscheidung

dieser Zellbestandteile von Einschlüssen, die man als Zymogengranula beschrieben hat, ist oft unmöglich. Ebenfalls in hormonproduzierenden (endokrinen) Organen, wie Thyreoidea (Abb. 14 A), Nebennierenrinde (Abb. 14 B), Rattenplacenta und Ovar (Abb. 14 C), konnten mit der sauren Phosphatase Lysosomen nachgewiesen werden. In den endocytotisch hochaktiven neutrophilen Granulocyten, alveolären Deckzellen, Milzmakrophagen und den Zellen der Neuroglia (Abb. 15 A) fanden sich zahlreiche Zelleinschlüsse, die jene saure Hydrolase in besonders hoher Konzentration enthielten.

Das enzymatische Reaktionsprodukt in der Milz und seine Verteilung

Für die retikuloendothelialen Zellen der Milz wurde eine hohe Enzymaktivität mit dem Substrat Natrium-beta-Glycerophosphat bei p_H 5,3 festgestellt (Abb. 1/3/5). Eine wesentlich schwächere Hydrolyse konnte bei p_H 6,0 beobachtet werden (Abb. 4B/8B), und bei einem p_H von 7,4 der Inkubationslösung wurde dieser Ester in der Milz nicht gespalten. Daraus ergibt sich, daß mit dem Reaktionsprodukt in diesem Organ nur die saure Phosphatase nachgewiesen ist. Dieses Enzym kommt reichlich in den Milzmakrophagen vor, in etwas geringerer Menge im Sinusendothel, vereinzelt innerhalb der Plasmazellen und äußerst selten in den Retikulumzellen. In einigen Schnitten sind auch im Cytoplasma außerhalb der Lysosomen und im Caryoplasma Enzymgranula von 200 bis 600 Å in kleiner Anzahl zu finden.

Die Makrophagen der Milz

Von den Retikulumzellen unterscheiden sich die Makrophagen besonders durch ihren Reichtum an Organellen. Sie werden von einer etwa 30 Å dicken Membran umgeben, deren Infrastruktur

elektronenmikroskopisch aus drei Schichten besteht: Eine helle Zone, etwa 20 Å breit, wird von zwei dunklen Lamellen mit je 25 Å Breite flankiert (membrane unit). Die Membranen benachbarter Zellen verlaufen über weite Strecken parallel; desmosomenähnliche Verdichtungen an gegenüberliegenden Membranbezirken wurden aber nicht beobachtet. Zu den Räumen des Pulporetikulum hin haben die Zellmembranen der Milzmakrophagen zahlreiche tiefe intracytoplasmatische Einfaltungen (Abb. 1).

Die Kerne sind der ovalen bis polygonalen Zellform angepaßt und zeigen stellenweise größere Einbuchtungen. Die Kernhülle besteht aus zwei 80 Å dicken Membranen, die einen etwa 150 Å breiten perinucleären Raum begrenzen. In einigen 500 Å weiten Abschnitten ist die Kernhülle unterbrochen durch sog. Kernporen, an deren Rändern die äußere und innere Membran deutlich ineinander übergehen.

Der äußeren Kernmembran sitzen vereinzelt 150 bis 200 Å große Granula (Ribosomen) auf. Körnchen dieser Größenordnung befinden sich in geringer Anzahl auch im gesamten Caryoplasma verteilt, vorwiegend jedoch im Bereich des Nucleolus.

Das Cytoplasma enthält außer den bekannten Zellorganellen noch eine größere Zahl vakuolenartiger Strukturen, die ein fein- bis grobgranuläres oder auch homogenes Material beherbergen (Abb. 2/3).

Die Mitochondrien sind je nach Anschnitt rund bis oval und zeigen einen Durchmesser von 0,2 bis 0,8 µ. Ihre Matrix ist ein wenig elektronendichter als das umgebende Cytoplasma. Sie werden von zwei 70 bis 90 Å dicken Membranen umhüllt, die einen etwa 100 Å breiten Abstand voneinander haben. Die innere Membran bildet leistenähnliche Einfaltungen, Christae mitochondriales, die in den Makrophagen gut entwickelt sind (Abb. 8B/10B).

Das endoplasmatische Retikulum (ER) dieser Zellen liegt

reichlich ausgebildet vor in Form abgeplatteter Säcken und Tubuli, die 200 bis 500 Å breit und bis zu 1 µ lang sind. Ihre begrenzenden etwa 80 Å dicken Membranen sind entweder glatt (glattwandiges ER) oder besitzen zum Cytoplasma hin einen Ribosomenbesatz (ergastoplasmatisches ER). Freie Ribosomen, oft rosettenartig gruppiert, treten zahlreich im Cytoplasma auf und haben einen Durchmesser von 150 bis 200 Å.

Der Golgi-Apparat (Abb. 11B) besteht aus mehreren parallel in Gruppen angeordneten Hohlräumen, röhrenförmige und bläschenartige Strukturen, deren begrenzenden Membranen 80 Å dick sind. Die Vesikeln und Vakuolen, die mitunter eine elektronendichte, homogene Substanz enthalten, kommen auch außerhalb der Golgi-Zone vor. Zentriolen gelangten nur selten zur Abbildung.

Die Maschen des Pulparetikulums sind mit Erythrocyten angefüllt. Anteile der roten Blutkörper liegen auch in den Einstülpungen der Milzmakrophagen und ebenfalls innerhalb deren Cytoplasma (Abb. 1/2/3). Diese noch nicht oder schon phagocytierten Anteile der E r y t h r o c y t e n haben einen Durchmesser von 0,2 bis 4,5 µ (Abb. 4A/5A). Im Cytoplasma befinden sich membranbegrenzte polymorphe Körper gleicher Größenordnung, deren Inhalt in einigen Bereichen die Dichte des Blutfarbstoffes aufweist (Abb. 3B/4B/6A) und zusätzlich aus feinen dichten Partikeln besteht. Bei stärkerer Vergrößerung sind in solchen dichten Teilchen, die einen Durchmesser von 50 Å bis 60 Å besitzen, bis zu vier Granula als Untereinheiten zu erkennen (Abb. 6/7C). Diese Struktur wurde von RICHTER (1957/64) und BESSIS (1961) für das Ferritinmolekül beschrieben. Die membranbegrenzten polymorphen Zelleinschlüsse, die ein eisenhaltiges Pigment (z.B. Ferritin) aufweisen, werden nach RICHTER (1957/59) S i d e r o s o m e n genannt. Diese Einschlüsse treten in drei verschiedenen Formen auf,

zwischen denen aber Übergänge vorliegen. Der Inhalt einiger Körper gleicht in der Dichte dem Hämoglobin und läßt im Inneren und an der Peripherie Ferritinpartikel in 500 bis 3000 Å breiten Zonen erkennen (Abb. 4A/5B). Andere Siderosomen (zweite Gruppe) sind gleichmäßig von diesen feinen, dichten Partikeln angefüllt und weisen nur tropfenartige bis fingerförmige etwa 0,1 µ große Bereiche des homogenen dem Hämoglobin gleichenden Materials auf (Abb. 4B/8B). Diese zweite Gruppe tritt bei unterschiedlicher Größe von 0,2 µ bis 4,5 µ Durchmesser in mannigfaltigen Formen auf: oval, stark gelappt und stäbchenartig (Abb. 8); hier ist aus der zweidimensionalen elektronenoptischen Abbildung auf eine recht bizarre Gestalt des Körpers zu schließen. Die dritte Gruppe dieser cytoplasmatischen Körper enthält ausschließlich Ferritinpartikel (Abb. 7A/9A), entspricht aber in der Größe und der Gestalt den übrigen Siderosomen, in denen zusätzlich hämoglobindichtes Material liegt.

Im Sinusendothel beobachtet man seltener Erythrocytenanteile und Siderosomen als in den phagocytotisch recht aktiven Milzhistiocyten; die Retikulumzellen sind frei von eisenhaltigen Einschlüssen.

In den Milzmakrophagen befindet sich das Enzym saure Phosphatase in zwei verschiedenen Einschlüssen, die beide von einer Membran begrenzt werden und nach de DUVE (1955/64) als **L y s o s o m e n** bezeichnet werden. Bei der einen Form lokalisiert sich die Enzymaktivität in Plaques auf einer homogenen Matrix, deren Dichte geringer ist als jene der Erythrocyten. Diese Lysosomen haben vorwiegend eine runde Gestalt mit einem Durchmesser von etwa 0,4 bis 0,8 µ. Bei der zweiten Form der enzymhaltigen Einschlüsse liegt das Reaktionsprodukt der sauren Phosphatase, Bleiphosphat, in einer feingranulierten Grundsubstanz mit benachbarten Hämoglobinabschnitten (Abb. 4A/5B). Die feinen, dichten Partikel in

der Matrix identifizieren sich bei höherer Auflösung als Ferritinmoleküle (Abb. 6).

Somit haben wir in den Milzhistiocyten lysosomale Enzymaktivität in cytoplasmatischen Einschlüssen gefunden, die hämoglobin- und eisenhaltig sind.

Siderosomen enthalten in hohem Maße Enzymaktivität der sauren Phosphatase

Das Produkt der enzymatischen Reaktion, Bleiphosphat, erscheint scharf lokalisiert als Plaques in den Siderosomen der Makrophagen und des Sinusendothels. Die Bleiphosphatmoleküle sind zu 60 Å bis 900 Å breiten Aggregaten ohne erkennbare Unterstruktur angeordnet und in den Siderosomen stets von Ferritinpartikeln umgeben (Abb. 7A). Diese Plaques sind annähernd gleichmäßig verteilt in der eisenhaltigen Matrix und in einigen Fällen in unmittelbarer Nachbarschaft des hämoglobindichten Materials gelegen (Abb. 3B/6A). Die in drei Gruppen eingeteilten ferritinhaltigen Zelleinschlüsse sind also per definitionem Lysosomen.

In einigen Vakuolen ist das Enzym nur als schmaler Saum von 60 Å bis 200 Å Breite, der inneren Membranlamelle anliegend, dargestellt (Abb. 10). Die Abstände unter den Ferritinpartikeln betragen in den Siderosomen etwa 80 bis 160 Å. Lediglich in einigen enzymfreien Bezirken der dritten Gruppe, die kein Hämoglobin enthält, treten die Ferritinmoleküle dichter gepackt auf mit etwa 40 Å Abstand in runden Zonen von 0,1 bis 0,5 µ (Abb. 6A/7/9B).

Die Membranen der Lysosomen und der bleiphosphatfreien Siderosomen sind 70 bis 90 Å dick; sie entsprechen ebenfalls in feinerem Aufbau der Zellmembran (zwei dichte Lamellen begrenzen eine etwa 20 Å breite Zone). Ferritinmoleküle findet man auch frei im Cytoplasma außerhalb der

Siderosomen; in anderen Zellorganellen erkennt man keine eisenhaltige Granula. Die Enzymaktivität konnte vollständig gehemmt werden durch 0,01 M Natriumfluorid. Auch nach Inkubation ohne Substratzusatz (Leerwert) trat kein unspezifischer Bleiniederschlag auf. Eine Diffusion des Enzyms oder seines Reaktionsproduktes (Bleiphosphat) während des Experimentes vom Wirkungsort in der Zelle in benachbarte Strukturen wie z.B. Mitochondrien konnte nicht beobachtet werden.

Bei der Beurteilung der ultramikroskopischen Befunde ist weiter zu berücksichtigen, daß die Dichteunterschiede der zellulären Strukturen nicht in ihrem ursprünglichen Grad dargestellt wurden, sondern nach Einwirkung des Glutaraldehyds und nach Reduktion des Osmiumtetroxyds.

Diskussion

- I Der Abbau des Hämoglobins
 - 1) Die Zerstörung der Erythrocyten, intravasal und intrazellulär.
 - 2) Der Vergleich der Siderosomen in Milzmakrophagen mit ferritinhaltigen Strukturen anderer Organe, in denen sich nach Applikation von Hämoglobin eine Lyse des Blutfarbstoffes vollzieht.
 - 3) Die Endstadien der Hämolyse in den Milzmakrophagen. Siderosomen enthalten saure Phosphatase, sie stellen eine besondere Gruppe der Lysosomen dar.
 - 4) Die Wirkung des lysosomalen Cathepsins auf den Blutfarbstoff.
 - 5) Die Verteilungsmuster des Cathepsins und der sauren Phosphatase in den Lysosomen.
- II Die Synthese, Speicherung und Abgabe der lysosomalen Enzyme an die endocytotische Vakuole; die Bedeutung des Golgi-Apparates in diesem Zusammenhang.
- III Die eisenhaltigen Produkte des Hämoglobinabbaues: Ferritin und Siderin.
- IV Der Abbau des Blutfarbstoffes in der Milz und den übrigen Organen.
- V Die Bedeutung der Lysosomen im Organismus.

Diskussion

=====

I Der Abbau des Hämoglobins

1. Zerstörung der Erythrocyten, intravasal und intrazellulär

Bei der Elimination der gealterten roten Blutkörperchen sind nach den Befunden verschiedener Autoren (v.HERRATH 1935/58, BAUMGARTNER 1954, CROSBY 1959, BESSIS 1961, WEISS 1961/62) physiologisch die retikulär angeordneten Histiocyten in den Lymphknoten, der Leber und der Milz entscheidend beteiligt. Zu den Fragen, wo die Zerstörung der roten Blutkörperchen beginnt, ob im strömenden Blut oder in den retikuloendothelialen Zellen, und wie dieser Zerfall bewirkt, vermuten ROUS und ROBERTSON (1924), daß die Erythrocyten an erster Stelle in der Milz und überwiegend erst nach Fragmentation phagocytiert werden. Auch CROSBY (1959), v.HERRATH (1958) und MOORE (1964) fanden Erythrocytenbruchstücke in den Milzmakrophagen. MASSHOFF (1950/54) und MAEGRAIT (1943) führten das intravasale Zerbrechen der roten Blutkörper auf die Wirkung eines Enzymes des Blutplasma zurück. Diese Autoren betonten, im Gegensatz zu ROUS u. ROBERTSON, daß physiologisch ein vollständiger Abbau extrazellulär erfolgte (humoraler Abbau) und eine Phagocytose fragmentierter Erythrocyten nur in sehr geringem Umfange vorliege. BERGHEM und FAHRAEUS (1936) machten aufgrund ihrer in vitro Versuche das sog. Lysolecitin für den Erythrocytenabbau innerhalb der Milzsinus verantwortlich. Eine verminderte Funktionstüchtigkeit der roten Blutkörper, die mit einer Strukturveränderung einhergeht, soll die Voraussetzung für ihren Abbau sein, wie RAABE (1958) und HERBST (1960) am Beispiel der mit Acridinorange geschädigten, reinfundierten Erythrocyten beim Hund feststellten und UETTMANN u. GORDON (1965) in der Ratte bei roten Blutkörperchen be-

schrieben, die mit N-aethylmaleimid in vitro geschädigt worden waren. JAFFE (1938) und STEWART (1950) betonten das mechanische Trauma, unter dem besonders die gealterten Erythrocyten auf ihrem Wege in das intersinusoidale Gewebe zerfallen. Nach MOORE (1964) sollen die roten Blutkörper aber äußerlich intakt vorliegen, bis sie die Poren der sinusoidalen Wand passiert haben. In den Milzmakrophagen lassen sich Erythrocytenbruchstücke und Siderosomen nachweisen. BLOOM (1962) und MOORE (1964) fanden sogar in seltenen Fällen intrazellulär gelegene degenerierende Erythrocyten. Die retikuloendothelialen Sinus-Zellen enthalten nur gelegentlich Produkte des Erythrocytenabbaues (DORFMAN 1961).

In dieser Arbeit sollte jedoch die Frage, ob intakte rote Blutkörperchen oder nur deren Bruchstücke phagocytiert werden, nicht geklärt werden; vielmehr sollte untersucht werden, ob eine Beteiligung lysosomaler Enzyme beim Abbau der Erythrocytenanteile in den Makrophagen der Rattenmilz vorliegt.

2. Vergleich der Siderosomen in den Milzmakrophagen mit ferritinhaltigen Strukturen anderer Organe, in denen sich nach Applikation von Hämoglobin eine Lyse des Blutfarbstoffes vollzieht.

In den Makrophagen der Milz findet man dichte Partikel von 50 Å bis 60 Å Durchmesser, die entweder frei im Cytoplasma oder in membranbegrenzten Körpern (Siderosomen) liegen. Bei höherer Auflösung erkennt man bis zu vier feine, dichte Granula als Untereinheiten; diese Anordnung beschrieben BESSIS (1961) und RICHTER (1957/64) für das Ferritin. Im Ferritinmolekül umgibt der Eiweißanteil (Apo ferritin) mantelartig den eisenhaltigen Bezirk, der aus sechs Granula besteht, die an den Ecken eines Oktaeders mit einer

Seitenlänge von 50 bis 60 Å liegen. Das einzelne Granulum hat einen Durchmesser von ungefähr 15 Å und enthält etliche Eisenhydroxyhydratmoleküle. Nach den Messungen von KERR (1964), BESSIS (1961), HARRISON (1963) und RICHTER (1964) weist das Ferritinmolekül einen Querschnitt von 105 Å auf. Diese besondere räumliche Anordnung der Granula erklärt auch, daß in der zweidimensionalen elektronenoptischen Abbildung maximal nur vier Ecken des Oktaeders dargestellt werden.

Die mit Ferritinmolekülen angefüllten Zelleinschlüsse (Siderosomen) in den Milzmakrophagen entsprechen den Strukturen, die RICHTER (1957/59) und MILLER (1960/64) in der Rattenniere nach intraperitonealer Injektion von Rattenhämoglobin beschrieben haben. WESSEL und GEDIGK (1959) fanden gleichartige cytoplasmatische Einschlüsse nach subkutaner Injektion von Rinderhämoglobin in den Histiocyten des entstandenen Granulationsgewebes. Auch diese Zellen bilden wie die Milzhistiocyten während der Aufnahme des Blutfarbstoffes tiefe Membraneinfaltungen. Ferritinhaltige Vakuolen konnten ebenfalls im Uterus der Ratten mit Vitamin-E-Mangel von LINDNER (1958) in den Makrophagen zwischen den Muskelzellen festgestellt werden. ESSNER und NOVIKOFF (1960 b) wiesen Siderosomen bei allgemeiner schwerer Siderose im humanen Leberparenchym um den Gallengängen nach. Jene Untersuchungen wie auch unsere zeigen, daß die Siderosomen keine veränderten Mitochondrien darstellen, was ursprünglich von RICHTER (1957) erklärt und später von ihm widerrufen wurde (1959).

3. Endstadien der Hämolyse; Siderosomen enthalten saure Phosphatase, sie sind damit eine besondere Gruppe der Lysosomen.

Die Aufnahme von Erythrocyten oder deren Bruchstücken wird mit einer reversiblen Adsorption an der freien Oberfläche

der retikulo-endothelialen Zellen eingeleitet. Die Substanzen liegen hierbei nicht direkt auf der äußeren elektronendichten Lamelle der Zellmembran, sondern auf einem Belag der Zellmembran, der nach FAWCETT (1965) und BENNETT (1963) aus Mucopolysaccharid-Protein-Komplexen bestehen soll, mit einer Dicke von 50 bis 100 Å. In diesem Zellmantel können auch jene Enzymsysteme gefunden werden, die an Membranoberflächen lokalisiert sind, so z.B. die innerhalb dieser Arbeit am Bürstensaum des Dünndarmes und des Nierenhauptstückes dargestellte alkalische Phosphatase. Durch eine Einstülpung der Zellmembran, deren Neubildung bei diesem Prozess ungeklärt ist, gelangt das Material in das Innere der Zelle. Die Endstadien des intrazellulären Abbaues können, wie die vorliegenden Untersuchungen zeigen, morphologisch gut verfolgt werden. Die groben, unregelmäßig geformten, zum Teil bizarr anmutenden Erythrocytenbruchstücke weisen im Inneren und an der Peripherie verschieden breite Zonen auf, die aus Enzymaktivität und aus Ferritinpartikeln bestehen. Die charakteristische Dichte des Hämoglobins schwindet in jenen Bereichen und nach weiterer Lyse sind nur noch wenige Reste des Blutfarbstoffes sichtbar. Schließlich befinden sich in den Zelleinschlüssen der Histiocyten lediglich Ferritinmoleküle und enzymatisches Reaktionsprodukt. Diese Vakuolen mit feingranulärem Eisen sind infolge ihres Gehaltes an saurer Phosphatase als Lysosomen zu bezeichnen, genauer gesagt als sekundäre Lysosomen (Sidero-Lysosomen), da in ihnen das Hämoglobin enzymatisch abgebaut wird. Unter den Sidero-Lysosomen befanden sich keine Einschlüsse mit lamellenartig eingelagerten Strukturen, sog. Restkörper (residual bodies), die nach den Befunden von MILLER (1960/64) und STOECKENIUS (1957) in der Endphase des Hämoglobinabbaues auftreten sollen. Vielmehr bilden jene Membranbegrenzten Körper, die ausschließlich Ferritinmoleküle enthalten, das Endstadium der Verdauungsvakuole.

4. Wirkung des lysosomalen Cathepsins auf den Blutfarbstoff

Bevor man sich der Frage zuwendet, welches lysosomale Enzym beim Abbau des Blutfarbstoffes beteiligt ist, wird es nötig sein, sich über die Produkte der einzelnen chemischen Reaktionen klar zu werden. Das Hämoglobin ist die Verbindung eines Proteins, des Globins, mit dem Häm, der prosthetischen Gruppe. Im Häm liegt das Eisen zweiwertig vor und steht in Nebenvalenzbeziehung zum Stickstoff des benachbarten Histidin im Globin (SCHROEDER 1963). Das Globin wird von vier unterschiedlichen Peptidketten aufgebaut (BRAUNITZER 1961), an die jeweils eine Hämgruppe gebunden ist. Die Aminosäuresequenz des Humanhämoglobins konnte durch HOBOM, HILSCHMANN und BRAUNITZER (1964) analysiert werden. Beim Abbau des Blutfarbstoffes entsteht zunächst unter Oxydation ein grüner Farbstoff (Verdoglobin), der das Globin und dreiwertiges Eisen enthält, bei dem aber der Porphinring zwischen dem Pyrrolkern I und II unter Abgabe eines Methin-Kohlenwasserstoffes gespalten ist. Aus dem Verdoglobin geht nach Abspaltung der Proteineisenkomponente der Pyrrolfarbstoff Biliverdin hervor. Die weitere Umwandlung der Gallenfarbstoffe - Biliverdin zu Bilirubin, in der Leber dann zu Bilirubinglucuronid (sog. direktes Bilirubin und schließlich im Darm zu Urobilin und Stercobilin - gilt nach KARLSON (1963) als gesichert. Der Proteinanteil der Globineisenkomponente wird vermutlich um kleinere oder größere Aminosäuregruppen unter Enzymwirkung reduziert. Dabei ist unter den lysosomalen Enzymen wahrscheinlich das Cathepsin wirksam. Die proteolytische Aktivität des Cathepsins beträgt nach den Untersuchungen von PRESS (1960) etwa ein Drittel der Stärke der Peptidase Chymotrypsin. Das Cathepsin soll in der Milz in hoher Konzentration enthalten sein (PRESS 1960). Eine hämolytische Wirkung des Cathepsins wurde durch ANSON schon 1936 festge-

stellt; COHN (1960) verwendete infolgedessen das Hämoglobin als Substrat zum Nachweis des Cathepsins! Die elektronenoptischen Abbildungen zeigen das Eisen feingranulär als Ferritin innerhalb der Lysosomen. In diesen Vakuolen könnte das Ferritin entstehen einmal durch Kopplung von Eisenpeptid-Komplexen untereinander, die aus der Hydrolyse der Globineisenkomponenten hervorgegangen sind. Charakteristische Abschnitte der Aminosäuresequenz des Globins wären dann im höhermolekularen Apoferritin aufzufinden. Zur Beurteilung dieser Zusammenhänge fehlt ebenfalls eine Analyse der Aminosäuresequenz des Apoferritins. Oder es entstehen (als zweite Möglichkeit) nach Cathepsineinwirkung kleinere Eisenaminosäure-Einheiten, die an einen (apoferritinähnlichen) Eiweißkörper gebunden werden, der sekundär in das Lysosom gelangt. In beiden Fällen müssen in den Sidero-Lysosomen neben dem proteolytischen Enzym noch andere, die Synthese katalysierenden Enzyme vorhanden sein. Ungeklärt ist weiter, warum das Apoferritin nicht unter einer Proteolyse durch lysosomale Enzyme zerfällt. Im Ferritin hat das Eisen im Gegensatz zum Häm drei Valenzen im Hydroxyhydrat (MAZUR 1963).

5. Verteilungsmuster des Cathepsins und der sauren Phosphatase in der Matrix der Lysosomen

In der vorliegenden Arbeit wurde von den Hydrolasen aus technischen Gründen nur die saure Phosphatase in den hämoglobin- und ferritinhaltigen Zelleinschlüssen dargestellt. Das Reaktionsprodukt (Bleiphosphat) dieser Enzymaktivität befindet sich lediglich in einigen Bereichen in unmittelbarer (elektronenoptischer) Nachbarschaft zum Hämoglobin. Hierzu muß betont werden, daß nicht die saure Phosphatase, sondern das Cathepsin proteolytisch wirksam ist, und daß beide Enzyme vermutlich nicht identische Orte im Lysosom einnehmen. Zum anderen ist eine direkte Beziehung der Enzym-

aktivität zur Dichte des Blutfarbstoffes nicht zu erwarten, weil die dem Hämoglobin eigene Dichte noch vor der Abspaltung der Globineisen-Komponente und damit auch vor der Proteolyse verlorengeht! Die saure Phosphatase wird, da sie in den Lysosomen immer vorkommt, als ein verlässliches Leitmerkmal zum Nachweis der Lysosomen angesehen (de DUVE 1955/63/64, NOVIKOFF 1964). In der Lysosomenfraktion der Leber hat de DUVE 1959 erstmalig die einzelnen sauren Hydrolasen nachweisen können. Aber auch in der Niere (STRAUSS 1956), in den neutrophilen Granulocyten (COHN 1960) und in der Mucosa des Dünndarmes (LICHU 1964) wurden verschiedene lysosomale Enzyme festgestellt wie saure Phosphatase, β -Glucuronidase, Ribonuclease, Desoxyribonuclease und Cathepsin. Eine hohe Konzentration der sauren Phosphatase und des Cathepsins ist ebenfalls in den Alveolarhistiocyten nachweisbar (COHN 1963). Aufgrund verbesserter Zellfraktionierung vermutete man unterschiedliche Enzymspektren der Lysosomen in den einzelnen Organen; die saure Phosphatase und das Cathepsin sollen jedoch in diesen Zellorganellen stets enthalten sein (de DUVE 1963). Nach den licht- und elektronenmikroskopischen Befunden von GOLDFISCHER (1965) scheint die lysosomale Arylsulphatase, eine ähnliche Verteilung im Organismus zu haben wie die saure Phosphatase, so daß die Arylsulphatase zur Identifizierung der Lysosomen herangezogen werden könnte. Unbekannt ist jedoch, ob dieses Enzym ebenfalls mit dem Cathepsin vergesellschaftet ist.

II Die Synthese, Speicherung und Abgabe der lysosomalen Enzyme an die phagocytotische Vakuole; die Bedeutung des Golgi-Apparates in diesem Zusammenhang

Die (anorganischen) Katalysatoren erleiden unter der Reaktion keine dauernde Veränderung und brauchen daher nicht erneuert zu werden. Die Enzyme (Biokatalysatoren) ordnen

ebenfalls das Elektronenpotential der Ausgangsprodukte der chemischen Umsetzungen bei Erhaltung ihres Funktionszustandes. Infolge ihres Eiweißcharakters unterliegen die Biokatalysatoren jedoch einem Zyklus von ihrer Entstehung bis zum Verlust ihrer Wirkung. Die aktiven Zentren der Enzyme werden gebildet von Aminosäuren mit reaktionsfähigen Seitenketten (Histidin, Serin, Cystein u.a.), die mit dem Substrat in Wechselwirkung treten. Eine reaktionsfähige Aminosäure ist mit dem Histidin auch im Hämoglobin enthalten, wodurch das Elektronenpotential des Sauerstoffes für die hämatogene Verteilung stabilisiert wird. Schließlich gliedert sich der Blutfarbstoff mit dem Sauerstoff innerhalb der Mitochondrien in das Redox-Fließgleichgewicht der Atmungsenzyme ein. Dieses wird möglich durch das aktive Zentrum im Globin und wahrscheinlich auch durch die Fähigkeit zum kurzfristigen Valenzwechsels des Eisens im Häm. In der Atmungskette entsteht bekanntlich nach Oxydation des Eisens der Cytochromoxydase vom zwei- zum dreiwertigen Zustand als Endprodukt durch die frei werdenden Elektronen Energie und Wasser. Aufgrund dieser Funktion des Hämoglobins ist es durchaus möglich, daß RICHTER (1957) in den Mitochondrien feingranuläres Eisen gefunden hat, herrührend vom Zerfall der eisenhaltigen Enzyme in den Mitochondrien. Das Wirkungsoptimum der Enzyme bei einem bestimmten p_H -Wert und bei einer bestimmten Temperatur ist bedingt durch den funktionsspezifischen Dissoziationsgrad des aktiven Zentrums, das die jeweils notwendige Protonenumlagerung (zur Bildung von A T P) einleitet.

Die Proteinsynthese der Enzyme erfolgt an den Ribosomen. Von den Ribosomen, soweit diese frei im Cytoplasma liegen, gelangt der Eiweißkörper (Apoenzym) zu Strukturen wie z.B. Vakuolen und Vesikeln und entfaltet nach Kopplung an die prosthetische (Coenzym) eine gerichtete Aktivität. Von den ergastoplasmatischen Ribosomen wird das Enzymprotein wahrscheinlich durch die Membran des endoplasmatischen Retikulums

in den Tubuli zum Golgi-Apparat transportiert; in Analogie zu der autoradiographisch-elektronenoptischen Aufzeichnung des Verbleibens einer radioaktiv markierten Aminosäure in einem synthetisierten Eiweißkörper durch CARO und PALADE (1964) im exkretorischen Anteil des Pankreas. Dieses Forscher-Team fand das Protein schließlich in Vesikeln und Vakuolen, die nicht mehr zur Golgi-Zone gehörten. Möglicherweise ist ein ähnlicher Weg für das Protein Apoferritin nachzuweisen, bevor es beim Hämoglobinabbau zur Aufnahme des Eisenamino-säure(n)-Komplexes in den sekundären Lysosomen bereit liegt.

NOVIKOFF (1962/64) kam durch seine Untersuchungen, vorwiegend mit der Thiamin-Pyrophosphatase, zu entsprechenden Vorstellungen über den Weg des Enzymproteins. Er fand die Thiamin-Pyrophosphatase deutlich im Ergastoplasma lokalisiert und beobachtete, daß sich von den fermentgefüllten glatten Tubuli und Säckchen des Golgi-Apparates Vesikeln und Vakuolen mit Enzyminhalt abschnürten. In der Golgi-Zone werden besonders in endocytotisch und sekretorisch aktiven Zellen dauernd neue Membranen gebildet, die bei der Sekretion von Stoffen mit der Zellmembran verschmelzen und wahrscheinlich auch die Oberflächenvergrößerung der Zelle bei der Phagocytose ermöglichen. Hiermit bot sich also der Knoten zu einem Analogieschluß von der Thiamin-Pyrophosphatase zu den lysosomalen Enzymen in ihrem Weg von dem Sytheseort bis zu ihrer Funktion in der phagocytotischen Vakuole. Eine Vorstellung, die NOVIKOFF als erster entwickelte, obwohl, wie MILLER (1964) betont, keine Beziehung der endocytotischen Vakuolen zu den statistisch äußerst seltenen saure-phosphatasehaltigen Anteilen des Golgi-Komplexes besteht. Die Befunde von MILLER können wir nach unseren Untersuchungen an mehreren Organen bestätigen. Wahrscheinlich wird die saure Phosphatase im inaktiven Zustand zu den Verdauungsvakuolen transportiert. Verlässliche Auskunft über den Weg der lysosomalen Enzyme von der

Synthese ihres Proteinanteiles an den Ribosomen ist bislang nur durch Verfolgung entsprechend radioaktiv markierter Aminosäuren möglich!

III Die eisenhaltigen Produkte des Hämoglobinabbaues:

Ferritin und Siderin

Bei dem Abbau des roten Blutfarbstoffes soll bekanntlich außer Ferritin noch ein weiteres eisenhaltiges Pigment, das Siderin entstehen. Bisher war man der Ansicht, daß bei geringem Eisenangebot das Ferritin und bei erhöhtem Angebot das Siderin in der Zelle gespeichert wird (WESSEL u. GEDIGK 1959, WINTROBE 1962, HARRIS 1963). Entgegen dieser Lehrmeinung fand WÖHLER (1964) 40 Minuten nach intravenöser Injektion von radioaktivem Eisen (Ferrosulfid) in der Milz des Kaninchen nur Siderin! (Das Siderin bleibt im Elektropherogramm am Auftragsort liegen.) 24 Stunden nach der Ferrosulfidgabe ($^{59}\text{Fe}^{2+}$) fand WÖHLER das radioaktive Eisen im Ferritin! Das Siderin war nicht mehr nachweisbar (die Siderin- und Ferritinbanden wurden in den Elektropherogrammen autoradiographisch und mit der Berliner-Blaureaktion sichtbar gemacht). Das bedeutet, daß inzwischen ein Aufbau des Ferritins aus dem Siderin erfolgte entgegen der bisherigen Annahme! Mit der durchgeführten Methode unserer Arbeit konnte diese Frage, welches der beiden Pigmente zuerst entsteht, nicht geklärt werden; denn elektronenmikroskopisch werden lediglich Dichteunterschiede bestimmt und das Eisen liegt in beiden Pigmenten in Aggregaten als Eisenhydroxyhydrat vor (BESSIS 1959). Einzig der unterschiedliche Eisengehalt: Ferritin 20 bis 24 % (LAUFBERGER 1937) und Siderin 36,9 % (WÖHLER 1964), könnte als Hinweis dafür dienen, daß in einigen Zelleinschlüssen, in denen die Partikel besonders dicht liegen und etwas größer erscheinen, Siderin vorhanden sein könnte. Über das Siderin besitzen wir infolge der aufwendigen Iso-

lierungstechnik nur wenige chemische Daten (Mc KAY 1964). In der Aminosäuresequenz sind beim Pferd Ferritin und Siderin recht ähnlich, ebenso im Kohlenhydratgehalt (Galactose, Mannose, Fucose, Hexosamin, Neuraminsäure). Aus dem Gehalt an Desoxyribose, Guanin und Phosphorsäure im Siderin schließt WÖHLER (1964) auf einen Nucleotidanteil von 18 % bei einem Proteinanteil von 17 %. Bemerkenswerterweise liegt der Stickstoffgehalt (WÖHLER 1964) des Siderins (8,9 %) niedriger als der des Ferritins (10 %).

IV Der Abbau des Blutfarbstoffes in der Milz und in den übrigen Organen

Die Wirksamkeit der normalen Milz als Filterorgan für abnorm geformte oder strukturell minderwertige Erythrocyten bei kongenitalen hämolytischen Anämien (Elliptocytose, Sphärocytose, Thallassämien u.a.) ist bekannt (MOLLISON 1959, JANDL 1961). Die Histiocyten der Milz sind endocytotisch äußerst aktiv und besitzen hohe proteolytische Potenzen, die bei stärkerem Eiweißzerfall nach Verbrennungen, Muskelzertrümmerung, nach neoplastischer oder kreislaufbedingter Gewebseinschmelzung und bei Hämatomen beansprucht werden. Erfolgt der Hämoglobinabbau in anderen Organen als Milz, Lymphknoten, dem Knochenmark und der Leber, so kann das freiwerdende Eisen zur Re-synthese des Blutfarbstoffes kaum genutzt werden. In der Niere vermag das Hauptstückepithel Hämoglobin aufzunehmen und abzubauen (LETTERER u. MASSHOFF 1949, MILLER 1960/64, ERICSSON 1965), doch wird das feingranuläre Eisen überwiegend in das Lumen des Nephron abgegeben. Wenn es unter chronischer Stauung im Lungen-Kreislauf bei cardialer Insuffizienz zur Diapedese der Erythrocyten aus den Kapillaren und ihrer Phagocytose durch die Histiocyten in den Alveolen gekommen ist, dann findet man Eisengranula in diesen sog. Herzfehlerzellen, die sich von der Alveolarwand ablösen können und im

Auswurf erscheinen. Ebenso wie die Milzmakrophagen enthalten die pulmonalen Phagocyten reichlich Zelleinschlüsse mit saure Phosphataseinhalt; die Alveolarhistiocyten sind jedoch absolut unfähig, das Eisen dem Körper wieder zur Verfügung zu stellen. So kann bei der pulmonalen Siderose eine ernste Eisenmangel-Anämie entstehen (WYLLIE 1948).

V Die Bedeutung der Lysosomen im Organismus (zu ergänzenden Berichten siehe: de DUVE 1966, MERKER 1964/65, WEISSMANN 1965)

Nach differenzierter Fraktionierung von Zellhomogenaten beschrieb de DUVE (1955/59) die Lysosomen als neue Zellorganellgruppe. Bis heute sind in diesen Vakuolen dreizehn verschiedene saure Hydrolasen lokalisiert worden, unter ihnen das Cathepsin und die saure Phosphatase. Infolge ihres Enzymspektrums besitzen die Lysosomen eine erhebliche Bedeutung beim Abbau von Proteinen, Nucleinsäuren, Mucopolysacchariden, Kohlenhydraten und Lipiden (de DUVE 1963, WEISSMANN 1964). Damit können endocytisierte Substanzen gespalten werden, aber auch zelleigenes Material. Solange die begrenzende Membran des Lysosoms intakt ist, hydrolysieren die Enzyme ihre Substrate innerhalb dieses Organells. Nach Läsion der Lipoproteidmembran greifen die lysosomalen Enzyme auch außerhalb des Lysosoms gelegene Strukturen an (BROWN u. HAMDY 1965); die Zelle kann schließlich der Autolyse anheim fallen.

Von besonderem Interesse ist die hormonelle Regulation des Organismus. Die Primärwirkung der Hormone liegt in einer Steuerung des Fließgleichgewichtes in der Kette der biochemischen Reaktionen. Damit sind die Hormone den Enzymen übergeordnet (KARLSON 1963). Die Beeinflussung enzymatischer Vorgänge beruht erstens in einer Stimulierung der Gene zur Synthese neuer Enzymmoleküle. Entsprechende D N S-geprägte Informationen des Kernes gelangen dabei zu den Ribo-

somen. Zum anderen liegt der Hormoneffekt in der Aktivierung der vorhandenen Enzymsysteme durch Veränderung der Permeabilität der Membranen der Zelle. Dieser zweite Angriffspunkt wird besonders deutlich in den Organen Schilddrüse und Nebennierenrinde (NOVIKOFF 1964, GOLDFISCHER 1964, SCHWARZ W). Nach Stimulation durch thyreotropes Hormon spalten lysosomale Enzyme das Thyroxin von der Proteinbindung ab, bevor es aus dem Follikelepithel der Schilddrüse in die Blutbahn gelangen kann. In der Nebennierenrinde induziert das Corticotropin (ACTH) eine Aktivität der lysosomalen Proteasen hinsichtlich der gestapelten Lipoproteide, die reichlich in der Zona fasciculata anzutreffen sind; d.h. in steroidproduzierenden Zellen, die Mitochondrien vom Tubulus Typ besitzen (wie auch die Granulosa-Luteinzellen des Ovars und die Leydigischen Zellen des Hodens). Den Lysosomen kommt also eine wichtige Bedeutung zu in der Hierarchie der Hormondrüsen: Hypophyse (ACTH) - Lysosom - Cholesterinsynthese - NNR-Hormon. Die sog. Rückkopplung des Cortisons an die übergeordnete Drüse besteht in einer Verminderung der Membrandurchlässigkeit der Lysosomen in der NNR für die Enzyme sowie das Substrat (Lipoproteide). Doch über diese Eigenregulation hinaus bewirkt das Cortison eine Veränderung der Permeabilität der zellulären Membranen generell im Organismus. So werden die Lipoproteidmembranen der Erythrocyten, Mitochondrien und vor allem der Lysosomen geschützt vor einer Schädigung durch Endotoxine, Streptolysine, Viren, Vitamin-A-Überdosierung, und bemerkenswerter Weise auch vor der Zerstörung durch elektromagnetische Wellen des Längenbereiches $10^2 \text{ \AA}$ bis $10^{-4} \text{ \AA}$ (U V- und Röntgen-Strahlung) (WEISSMANN 1965).

Aus den besprochenen Ergebnissen und Problemen geht hervor, daß Permeabilitäts- und Transportfragen für das Stoffwechselgeschehen innerhalb der Zelle bedeutend sind. Unsere Kenntnisse auf diesem Gebiet unmittelbarer Hormonwirkung sind noch nicht sehr umfassend. In wie weit die Funktionen der

Milzhistiocyten, v.Kupfferschen Sternzellen, der Neuroglia (Fettkörnchenzellen), der Osteoclasten, und polymorphkernigen Leukocyten einer humoralen Steuerung im einzelnen unterliegen, ist nicht bekannt. Abschließend sollen kurz einige richtungsweisende Erkenntnisse reflektiert werden: Bei der rheumatoiden Arthritis wird der Knorpel zerstört durch lysosomale Enzyme der Histiocyten des Granulationsgewebes der inneren Synovialkapsel (WEISSMANN 1965). In der Leber sind nach SWIFT (1964) die Lysosomen an der Detoxifikation beteiligt. Bei einer bestimmten Art der Glycogenspeicherkrankheit (HERS 1963) fehlt genetisch dem Enzymmuster die lysosomale 1-4 Glucosidase. Mit der Pyelonephritis geht einher die hohe Ausscheidung von β -Glucuronidase und anderer Lysoenzyme im Urin (PROCKOP 1964). Beim Prostata-Carcinom ist im Serum der vermehrte Gehalt an saure Phosphatase seit langem bekannt.

Die elektronenoptische Darstellung der Lysosomen hat uns dem Verständnis mancher Lebensvorgänge nähergebracht und wird auch in Zukunft zur Klärung verschiedener Probleme beitragen. So könnte sich als Ursache des malignen Verhaltens etlicher Zellen eine Entartung im (lysosomalen) Enzymsystem herausstellen (de DUVE 1959/63). Die rasche hämatogene Metastasierung des Chorioepithelioms oder der cytopathogene Effekt der Viren ließen sich nach Ausarbeitung der Aryl-Sulphatase Methode zum Nachweis der Lysosomen entscheidend klären. Nach unseren Befunden vermuten wir auch eine Ausschüttung lysosomaler Enzyme als Ursache der gewebeschädigenden Wirkung des Trophoblasten bei der Einnistung des Ovum in der Decidua der Ratte.

Zusammenfassung

=====

Der Abbau der Erythrocytenfragmente nach ihrer Phagocytose durch Histiocyten der Milz wurde histochemisch mit dem Elektronenmikroskop bei Ratten untersucht. Die Milz wurde in Glutaraldehyd fixiert, in 40 μ dicke Gefrierschnitte im Cryostaten zerlegt und in einem Medium für saure Phosphatase inkubiert bei anschließender Nachfixierung in Osmiumtetroxyd.

Unter den Enzymen wurde die saure Phosphatase dargestellt, weil damit eine besondere Zellorganellgruppe nachgewiesen werden kann, in der neben diesem Enzym zahlreiche andere Hydrolasen enthalten sind, die Proteine, Kohlenhydrate, Lipide, Mucopolysaccharide und Nucleinsäuren spalten können. In der hier angewandten Methode (modifiziert nach GOMORI 1952) konnte durch Variation des p_H -Wertes sichergestellt werden, daß lysosomale Zelleinschlüsse in der Milz keine alkalische Phosphatase enthalten.

Die befriedigende Erhaltung der Feinstruktur ermöglichte eine Lokalisation des enzymatischen Reaktionsproduktes der sauren Phosphatase auf Zellstrukturen. Dabei konzentrierte sich das entstandene Bleiphosphat auf bestimmte Zelleinschlüsse, die nach einer entsprechenden Zellfraktion mit hoher Enzymaktivität Lysosomen genannt werden. In ihnen vollzieht sich die Auflösung der Erythrocytenrümpfe und des Blutfarbstoffes. Verschiedene Produkte in diesem Prozess konnten elektronenmikroskopisch nach ihrer Dichte als Hämoglobin und nach ihrer Feinstruktur als Ferritin identifiziert werden. In unterschiedlichen Mengen liegen das aufgenommene Hämoglobin, die lysosomale Enzymaktivität und das Ferritin im gleichen membranbegrenzten Körper. Diese Zelleinschlüsse werden infolge ihres Gehaltes an eisenhaltigem Pigment als Siderosomen bezeichnet. Die Siderosomen sind also eine besondere Gruppe der Lysosomen; sie gehören zu den sekundären Lysosomen, da in ihnen die Trümmer der roten

Blutkörperchen und das Hämoglobin abgebaut werden. An den enzymatischen Reaktionen ist unter den lysosomalen Hydrolasen das Cathepsin in den Sidero-Lysosomen beteiligt; denn diese saure Protease tritt gemeinsam mit der sauren Phosphatase auf (STRAUSS 1956, de DUVE 1959, ARCHER 1960, LICHU 1964) und ist in der Milz in hoher Konzentration enthalten (PRESS 1960). Die Frage, wie die lysosomalen Enzyme von ihrem Syntheseort an den Ribosomen in die phagocytotische Vakuole gelangen, konnte nicht geklärt werden. Wahrscheinlich werden die synthetisierten Enzymproteine in der Golgi-Zone in Vesikeln abgepackt (CARO 1964) und erst dann nach Assoziierung ihrer prosthetischen Gruppe in der endocytotischen Vakuole aktiv. Als Endprodukt des Hämoglobinabbaues läßt sich Eisen elektro-nenoptisch nachweisen; und zwar befindet es sich in Aggregaten (Fe^{3+} - Hydroxymoleküle) räumlich angeordnet an den Ecken eines Oktaeders (RICHTER 1964). Eine Entscheidung, ob jeweils Ferritin oder Siderin vorliegt, konnte nicht getroffen werden.

Durch Darstellung der Lysosomen in anderen Organen als der Milz (in Leber, Niere, Lunge, Pankreas, Prostata, Schilddrüse, Nebennierenrinde und Placenta) wurde nachgewiesen, daß diese Einschlüsse tatsächlich Zellorganellen sind und im Organismus weit verbreitet vorliegen.

Literatur

- ANSON, M.L. - The estimation of cathepsin with hemoglobin and the partial purification of cathepsin. *J.Gen. Physiol.* 20, 565 (1936).
- ARCHER, G.T., HIRSCH, G.J. - Isolation of granules from eosinophilic leucocytes and study of their enzyme content. *J.Exptl.Med.* 118, 277 (1963).
- ASCHOFF, L. - Das reticulo-endotheliale System. *Ergeb. inn.Med.u.Kinderheilk.* 26, 1 (1924).
- BARKA, T., SCHAFFNER, F., POPPER, H. - Acid phosphatase and reticuloendothelial system. *Lab.Invest.NY* 10, 590 (1961).
- BARKA, T., ANDERSON, P. - Histochemical methods for acid phosphatase using hexonium pararosaniline as coupler. *J.Histochem.Cytochem.* 10, 741 (1962).
- BARNETT, R.J. - The fine structural localisation of acetylcholinesterase at the myoneural junction. *J.Cell.Biol.* 12, 247 (1962).
- BAUMGARTNER, W. - Die erworbenen haemolytischen Anaemien und der haemolytische Transfusionszwischenfall. *Helvet. med.acta Basel, Serie A, Suppl.* 35, 6 (1954).
- BENNETT, H.S. - Morphological aspects of extracellular polysaccharides. *J.Histochem.Cytochem.* 11, 2 (1963).
- BERGENHEM, B., FAHRAEUS, R. - Über die spontane Haemolysinsbildung im Blut unter besonderer Berücksichtigung der Physiologie der Milz. *Zbl.exper.med.* 97, 555 (1936).
- BESSIS, M., BRETON-GORIUS, J. - Différentes aspects du fer dans l'organisme. I Ferritine et micelles ferrugineuses. II Différentes formes de l'hemosidérin. *J.Biophys. Biochem. Cytol.* 6, 231 (1959).
- BESSIS, M. - The blood cells and their formation. in: *The Cell*, vol.5, J.Brachet, E.Mirsky, NY, Academic Press, S. 185 (1961).
- BLOOM, W. FAWCETT, D.W. - A textbook of histology. Saunders, Philadelphia, Pennsylvania (1962) S. 112 u. 303.
- BRAUNITZER, G., GEHRLING-MÜLLER, R., HILSCHMANN, N., HILSE, R., HOBOM, G., RUDLOFF, V., WITTMANN-LIEBOLD, B. - Die Konstitution des normalen adulten Humanhämoglobin. *Hoppe-Seyler's Z. physiol.Chemie* 225, 283 (1961).
- BROWN, W.E., HANDY, M.K. - Lysosomal enzymes in bruised tissue. *Proceed.Soc.Exptl.Biol.Med.* 119, 778 (1965).

- BURNSTONE, M.S. - Enzyme Histochemistry. NY, Academic Press University of Chicago (1962) S.160.
- CARO, L.G., PALADE, G.E. - Protein synthesis, storage and discharge in the pancreatic exocrine cell. *J. Cell. Biol.* 20, 473 (1964).
- CLINE, M.J., BERLIN, N. - An evaluation of DFP³² and Cr⁵¹ as methods of measuring red cell life span in man. *Blood* 22, 459 (1963).
- COHN, Z.A., WIENER, E. - The particulate hydrolases of macrophages. *J. Exptl. Med.* 118, 991 (1963).
- COHN, Z.A., HIRSCH, J.G. - The isolation and properties of the specific cytoplasmic granules of the rabbit polymorphonuclear leucocytes. *J. Exptl. Med.* 112, 983 (1960).
- CROSBY, W.H. - Normal functions of the spleen relative to red blood cells: a review. *Blood* 14, 399 (1959).
- DAEMS, W.T. - Mouse liver lysosomes and storage. Thesis, Drukkerij "Lucator et Emerger", Leiden, (1962).
- DALTON, A.J., ZEIGLER, R.F. - A simplified method of staining thin sections of biological material with lead hydroxide for electron microscopy. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 7, 409 (1960).
- DAVIES, D.R. - The phosphatase activity of spleen extracts. *Biochem. J.* 28, 529 (1934).
- DORFMAN, R.F. - Nature of the sinus lining cells of the spleen. *Nature, L.* 190, 1021 (1961).
- de DUVE, C., PRESSMANN, B.C., GIANETTO, R., WATTIAUX, R., APPELMANS, F. - Tissue fractionation studies. VI Intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver tissue. *Biochem. J.* 60, 604 (1955).
- de DUVE, C. - Lysosomes, a new group of cytoplasmic particles. in: *Subcellular Particles*, T. Hayashi, NY, Pergamon Press (1959) S. 128.
- de DUVE, C. - The lysosome concept. in: *Lysosomes*, A.V.S. de Reuck, M.P. Cameron, London, J.A. Churchill (1963) S.1.
- de DUVE, C. - From cytochromes to lysosomes. *Fed. Proceed.* 23, 1045 (1964).
- de DUVE, C., WATTIAUX, R. - Functions of lysosomes. *Ann. Rev. Physiol.* 28, 435 (1966).
- ERICSSON, J.L. - Transport and digestion of hemoglobin in the proximal tubule. I Light microscopy and cytochemistry of acid phosphatase. *Lab. Invest.* 14, 1 (1965).
- ESSNER, E. - An electron microscopic study of erythrophagocytosis. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 7, 329 (1960 a).
- ESSNER, E., NOVIKOFF, A.B. - Human hepatocellular pigments and lysosomes. *J. Ultrastruct. Res.* 2, 474 (1960 b).

- ESSNER, E., NOVIKOFF, A.B. - Localization of acid phosphatase activity in hepatic lysosomes by means of electron microscopy. *J.Biophys.Biochem.Cytol.* 9, 773 (1961).
- FANCETT, D.W. - Surface specialization of absorbing cells. *J.Histochem.Cytochem.* 13, 75 (1965).
- GOMORI, G. - Distribution of acid phosphatase in the tissue under normal and pathological conditions. *Arch.Path.* 32, 189 (1941).
- GOMORI, G. - Microscopic histochemistry; principles and practice. Chicago, University of Ch.Press (1952) S. 193.
- GOLDFISCHER, S., ESSNER, E., NOVIKOFF, A.B. - The localization of phosphatase activities at the level of ultra-structure. *J.Histochem.Cytochem.* 12, 72 (1964).
- GOLDFISCHER, S. - The cytochemical demonstration of lysosomal aryl sulphatase activity by light and electron microscopy. *J.Histochem.Cytochem.* 13, 520 (1965).
- HARRIS, J.M. - The red cell; production, metabolism, destruction: normal and abnormal. Oxford, University Press, London (1963).
- HEILMEYER, L., BEGEMANN, H. - Blut und Blutkrankheiten. in: Lehrbuch d. inn. Med. L. Heilmeyer, Springer Verlag, Berlin Göttingen Heidelberg (1961) S. 376.
- v. HERRATH, E. - Bau und Funktion der Milz. *Ztschr.Zellforsch.* 23, 375 (1935).
- v. HERRATH, E. - Bau und Funktion der normalen Milz. W. de Gruyter & Co., Berlin (1958).
- HERBST, R. - Beobachtungen über den Verbleib infundierter, geschädigter Erythrozyten im Organismus. *Ztschr. mikroskop.-anat.Forsch.* 66, 121 (1960).
- HERS, H.G. - Alpha-glucosidase deficiency in generalized glycogen-storage disease. *Biochem.J.* 86, 11 (1963).
- HOBOM, G., BRAUNITZER, G., HILSCHMAN, N. - Über Hämoglobine XI, XII. Die Sequenzanalyse des Humanhämoglobins. *Hoppe-Seyler's Z. physiol.Chemie* 335, 1 (1964).
- HOLT, S.J., HICKS, R.M. - The localization of acid phosphatase in rat liver cells as revealed by combined cytochemical staining and electron microscopy. *J.Biophys. Biochem.Cytol* 11, 47 (1961).
- HOLT, S.J., HICKS, R.M. - Specific staining methods for enzyme localization at subcellular level. *Brit.Med. Bull.* 18, 214 (1962).
- JAFFE, R.H. - The reticuloendothelial system. in: Handbook of haematology, H. Downey, NY, P.B. Hobner (1938) S. 973 u. 1272.

- JANDL, J.H., SIMONS, R.L., CASTLE, W. - Red cell filtration and the pathogenesis of certain hemolytic anemias. *Blood* 18, 133 (1961).
- KARLSON, P. - Porphyrine u. Zellhämone; Hormone. in: Kurzes Lehrbuch d. Biochemie, G. Thieme Verlag, Stuttgart (1963) S. 147 u. 288.
- Mc KAY, R.H. - Horse spleen hemosiderin. I Isolation. II Further characterization. *Arch. Biochem.* 104, 487 (1964).
- KERR, D., MUIR, A. - A demonstration of the structure and disposition of ferritin in human liver cell. *J. Ultrastruct. Res.* 3, 313 (1960).
- KURTZ, S.M. - A new method for embedding tissue in vestopal W. *J. Ultrastruct. Res.* 5, 468 (1961).
- LAUFBERGER, L. - Sur la cristallisation de la ferritine. *Bull. Soc. Chim. biol. Paris*, 19, 1576 (1937).
- LAUDA, E. - Die normale und pathologische Physiologie der Milz. Urban Schwarzenberg Verlag, Berlin Wien (1933)
- LETTERER, E., MASSHOFF, W. - Über erythrolytische Nephrose. *Virchow Arch.* 317, 56 (1949).
- LEPENE, G. - Zerfall der roten Blutkörperchen beim Ikterus infektiosus (Weil). Ein weiterer Beitrag zur Frage des hämatogenen Ikterus, des Hämoglobin- und Eisenstoffwechsels. *Beitr. Path. Anat.* 65, 163 (1919).
- LICHU, H.S., TAPPEL, A.L. - Lysosomal enzymes of the rat intestinal mucosa. *J. Cell Biol.* 23, 233 (1964).
- LINDNER, E. - Der elektronenmikroskopische Nachweis von Eisen im Gewebe. *Ergeb. allg. Path. path. Anat.* 38, 46 (1958).
- LOCKWOOD, W.R., ALLISON, F.J. - Electron-micrographic studies of phagocytic cells. I Morphological changes of cytoplasm and granules of rabbit granulocytes associated with the ingestion of rough pneumococcus. *Brit. J. Exptl. Path.* 44, 593 (1963).
- MAEGRAITH, B., FINDLAY, G.M., MARTIN, N.H. - Mechanism of lysis of red blood cells. *Nature*, L 151, 252 (1943).
- MASSHOFF, W., BÖTTNER, E. - Über einen hämoglobinspalten-den Stoff im Blutplasma. *Med. Mschr.* 4, 21 (1950).
- MASSHOFF, W. - Eisenstoffwechsel und Leber. *Verhandl. deutsch. Ges. Verdauungs- u. Stoffwechselkrankh. XVII Tagung*, G. Thieme Verlag, Stuttgart (1954) S. 3.
- MAZUR, A., CARLETON, A. - Relation of ferritin iron to hem synthesis in marrow and reticulocytes. *J. Biol. Chem.* 238, 1818 (1963).

- MEIJER, A., WILLIGHAGEN, R. - Increased activity of acid phosphatase and β -glucuronidase in the liver and spleen of mice after intraperitoneal administration of various macromolecular substances. *Biochem. Pharmacol.* 8, 389 (1961).
- MERKER, H.J. - Die Lysosomen, eine neue Zellorganellgruppe. *Berliner Med.* 15, 237 (1964).
- MERKER, H.J. - Struktur und Funktion der Lysosomen. *Materia Med. Nordmark* Nov. 1965, S. 684.
- MILLER, F. - Hemoglobin absorption by cells of the proximal convoluted tubule in mouse kidney. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 8, 689 (1960).
- MILLER, F. - Acid phosphatase localization in renal protein absorption droplets. 5. Intern. Congr. electr. Micr. New York (1962) Q2.
- MILLER, F., PALADE, G. - Lytic activities in renal protein absorption droplets. An electron microscopical cytochemical study. *J. Cell Biol.* 23, 519 (1964).
- MOLLISON, P.L. - Measurement of survival and destruction of red cells in haemolytic syndromes. *Brit. Med. Bull.* 15, 59 (1959).
- MOORE, R.D., MUMAW, V.R., SCHOENBERG, M.D. - The structure of the spleen and its functional implications. *Exptl. Molec. Path.* 3, 31 (1964).
- MOVAT, H.Z., FERNANDO, N.P. - The fine structure of lymphoid tissue. *Exptl. Molec. Path.* 3, 546 (1964).
- NOVIKOFF, A.B. - Lysosomes and related particles. in: *The Cell*, vol. 2, J. Brachet, E. Mirsky, NY, Academic Press (1961) S. 423.
- NOVIKOFF, A.B., ESSNER, E. - Cytological studies on two functional hepatomas. Interrelations of endoplasmic reticulum, golgi apparatus and lysosomes. *J. Cell. Biol.* 15, 140 (1962).
- NOVIKOFF, A.B., ESSNER, E., QUINTANA, N. - Golgi apparatus and lysosomes. *Fed. Proceed.* 23, 1010 (1964).
- PALADE, G.E. - The endoplasmic reticulum. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 2 Suppl. 85 (1956).
- PRESS, E.M., PORTER, R., CEBRA, A. - The isolation and properties of a proteolytic enzyme, cathepsin D, from bovine spleen. *Biochem. J.* 74, 501 (1960).
- PREYER, E. - Über amöboide Blutkörperchen. *Virchow Arch. path. anat.* 30, 417 (1864).
- PROCKOP, D.J., DAVIDSON, W.D. - Study of urinary and serum lysozyme in patients with renal disease. *New Eng. J. Med.* 270, 269 (1964).

- RAABE, K. - Der Verbleib geschädigter Erythrocyten in der Milz. Ztschr.mikroskop.-anat.Forsch. 64, 591 (1958).
- REYNOLDS, H.S. - The use of lead citrate at high p_H as an electron-opaque stain in electron microscopy. J.Cell.Biol. 17, 208 (1963).
- RICHTER, G.W. - A study of hemosiderosis with the aid of electron microscopy. With observations on the relationship between hemosiderin and ferritin. J.Exptl.Med. 106, 203 (1957).
- RICHTER, G.W. - The cellular transformation of injected colloidal iron into ferritin and hemosiderin in experimental animals. J.Exptl.Med. 109, 197 (1959).
- RICHTER, G.W. - Electrophoretic and serological properties of the ferritins produced by Hela and KB cells in cultures. I Comparison with other ferritins. Brit.J.Exptl.Path. 45, 88 (1964).
- ROBERTS, D.K., LATTA, L. - Electron microscopic studies on the red pulp of the rabbit spleen. Anat.Rec. 148, 81 (1964).
- ROUS, P., ROBERTSON, J. - Destruction of red blood corpuscles in health and disease. Physiol.Rev. 3, 75 (1924).
- SABATINI, D., MILLER, F., BARNETT, R. - Aldehyd fixation for morphological and enzyme histochemical studies with the electron microscope. J.Histochem.Cytochem. 12, 57 (1964).
- SABATINI, D., BENSCH, K., BARNETT, R. - Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyd fixation J.Cell Biol. 17, 19 (1963).
- SCHROEDER, W.A. - The hemoglobins. in: Annual Rev.Biochem. California 32, 301 (1963).
- SCHWARZ, W. (unveröffentlicht)
- STEWART, W.B., STEWART, J.M., IZZO, M.D., YOUNG, L.E. - Age as affecting the osmotic and mechanical fragility of dog erythrocytes tagged with radioactive iron. J.Exptl.Med. 91, 147 (1950).
- STOECKENIUS, W. - Morphologische Beobachtungen beim intra-cellulären Erythrozytenabbau und der Eisenspeicherung in der Milz des Kaninchens. Klin.Wschr. 35, 760 (1957).
- STOECKENIUS, W. - Elektronenmikroskopische Untersuchungen am Retikulum der Milz. Verhandl.deutsch.Ges.Path. 42, 351 (1959).
- STRAUSS, W. - Cytochemical investigation of phagosomes and related structures in cryostat section of kidney and liver of rats after intravenous administration of horseradish peroxidase. Exptl.Cell Res. 27, 30 (1962).

- STRAUSS, W. - Concentration of acid phosphatase, ribonuclease, desoxyribonuclease, β -glucuronidase and cathepsin in "droplets" isolated from the kidney cells of normal rats. *J.Biophys.Biochem.Cytol.* 2, 513 (1956).
- STRAUSS, W. - Occurrence of phagosome and phago-Lysosome in different segments of the nephron in relation to the reabsorption, transport, digestion and destruction of intravenously injected horseradish peroxidase. *J.Cell Biol.* 21, 294 (1964).
- SWIFT, H., HRUBAN, Z. - Focal degradation as a biological process. *Fed.Proceed.* 23, 1026 (1964).
- ULTMANN, J.E., GORDON, C.S. - The removal of in vitro damaged erythrocytes from the circulation of normal and spleen-ectomized rats. *Blood* 26, 49 (1965).
- WATSON, M.L. - Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J.Biophys.Biochem.Cytol.* 4, 475 (1958).
- WEISS, L. - Observations on the red pulp of the spleen of rabbits and dogs by electron and light microscopy. *Anat.Rec.* 139, 286 (1961).
- WEISS, L. - The structure of splenic arterial vessels in relation to hemoconcentration and red cell destruction. *Am.J.Anat.* 111, 131 (1962).
- WEISSMANN, G. - Lysosomes. *Blood* 24, 594 (1964).
- WEISSMANN, G. - Lysosomes. *New Engl.J.Med.* 273, 1143 (1965).
- WESSEL, W., GEDIGK, P. - Die Verarbeitung und Speicherung von phagocytiertem Eisen im elektronenmikroskopischen Bild. *Virchow Arch.path.Anat.* 332, 508 (1959).
- WINTROBE, M.M. - Clinical hematology. Lea & Febiger, Philadelphia (1962) S. 122
- WÖHLER, F. - Ferritin und Hämosiderin. *Deutsch.Med.Wschr.* 39, 1801 (1964).
- WYLLIE, W.G. - Idiopathic pulmonary haemosiderosis. *Quart.J.Med.* 17, 25 (1948).
- ZUCKER-FRANKLIN, G. - Electron microscopic studies on the degranulation of rabbit peritoneal leucocytes during phagocytosis. *J.Exptl.Med.* 120, 569 (1964).

Abb. 1

=====

Übersichtsbild eines Makrophagen aus der Milz der Ratte mit starken Einstülpungen der äußeren Zellmembran ($\nearrow$) und zahlreichen Einschlüssen, die angefüllt sind von dem Reaktionsprodukt (Bleiphosphat) der sauren Phosphatase (X) . Erythrocyt (E) in engem Kontakt mit der Zellmembran. M = Mitochondrien, N = Nucleus
Enzymnachweis nach Vorfixation in Glutaraldehyd durch Inkubation in einem Medium des p_H -Wertes 5,3 mit einer Dauer von 10 Minuten, anschließend Osmiumtetroxyd-Fixierung.

Vergrößerung 1 : 20 000



Abb. 2

=====

Übersichtsbild eines Makrophagen der Rattenmilz
mit zahlreichen saure phosphatasehaltigen Zell-
einschlüssen (X). Erythrocyt (E)
tief im Cytoplasma (phagocytiert?).
M = Mitochondrien, No = Nucleolus, Inkubation
bei p_H 5,3

Vergrößerung 1 : 21 000



Abb. 3 A

=====

Ausschnitt des Cytoplasma eines Milzmakrophagen. Erythrocyt (E) umgeben von mehreren enzym-aktiven Einschlüssen (X) verschiedener Größe innerhalb des Cytoplasma. Inkubation bei p_H 5,3

Vergrößerung 1 : 42 000

Abb. 3 B

=====

Teil eines Milzhistiocyten mit unterschiedlichen Einschlüssen, die feine, dichte Granula enthalten, ohne Enzymaktivität (1) oder mit starker Aktivität (2). Außerdem ein Zelleinschluß mit der Dichte eines Erythrocyten (3) mit deutlich peripherer Enzymaktivität. Nachweis der sauren Phosphatase bei p_H 5,3
M = Mitochondrien

Vergrößerung 1 : 88 000

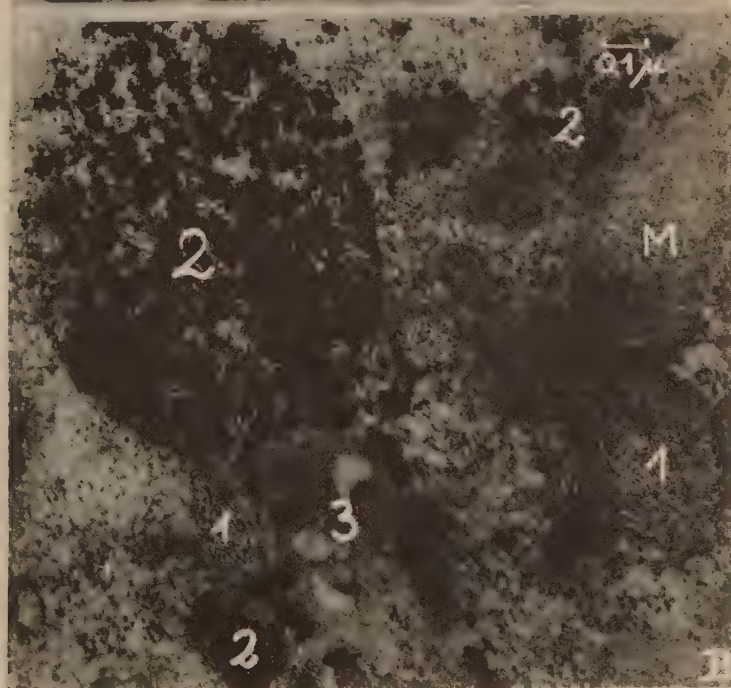
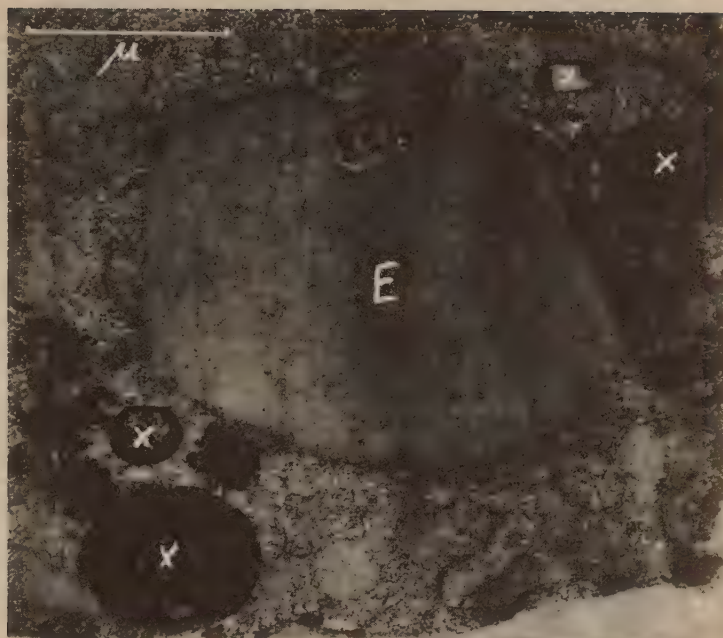


Abb. 4 A

=====

Ausschnitt eines Milzmakrophagen der Ratte mit einem großen, teilweise enzymaktiven (X) Einschluß, der Plaques von der Dichte eines Erythrocyten (↗) enthält. ZM = Zellmembran
eR = rauhwandiges endoplasmatisches Retikulum;
Inkubation bei p_H 5,3

Vergrößerung 1 : 63 000

Abb. 4 B

=====

Teil eines Zelleinschlusses im Milzhistiocyten mit elektronendichten, feinen Granula in dichter (3), lockerer (2) Packung und benachbart den Erythrocytenbruchstücken (1) mit Enzymaktivität (X); Inkubation bei p_H 6,0

Vergrößerung 1 : 70 000

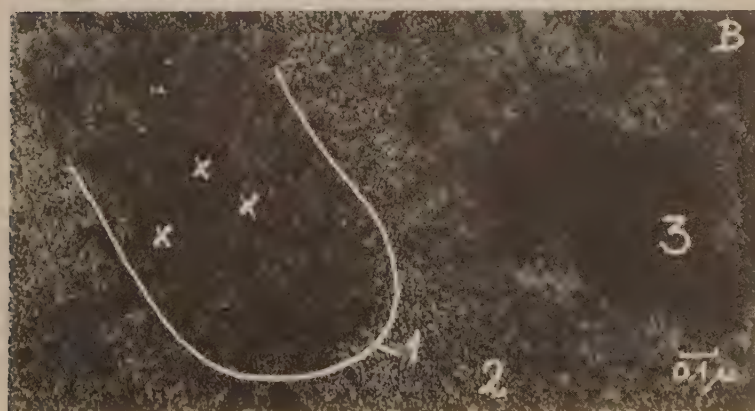


Abb. 5 A

=====

Eine Gruppe enzymaktiver Einschlüsse (X) eines Makrophagen aus der Milz. Erythrocyt (E) in engem Kontakt mit der Zellmembran. M = Mitochondrien; Inkubation bei p_H 5,3

Vergrößerung 1 : 30 000

Abb. 5 B

=====

Großer Zelleinschluß mit einem Verband von Erythrocytenbruchstücken (↗) und feinen, dichten Granula (o). Die Enzymaktivität (X) ist deutlich lokalisiert; p_H 5,3

Vergrößerung 1 : 30 000

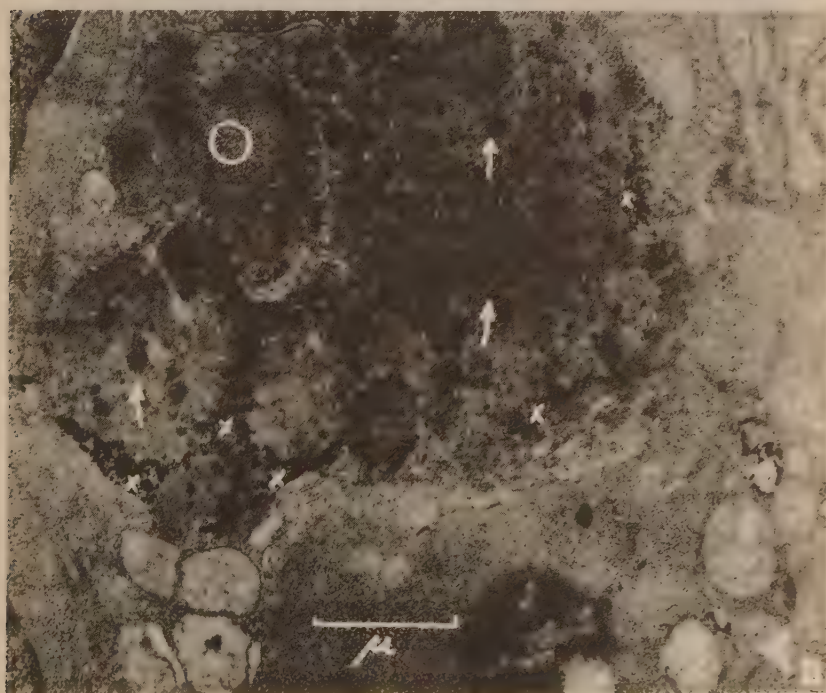
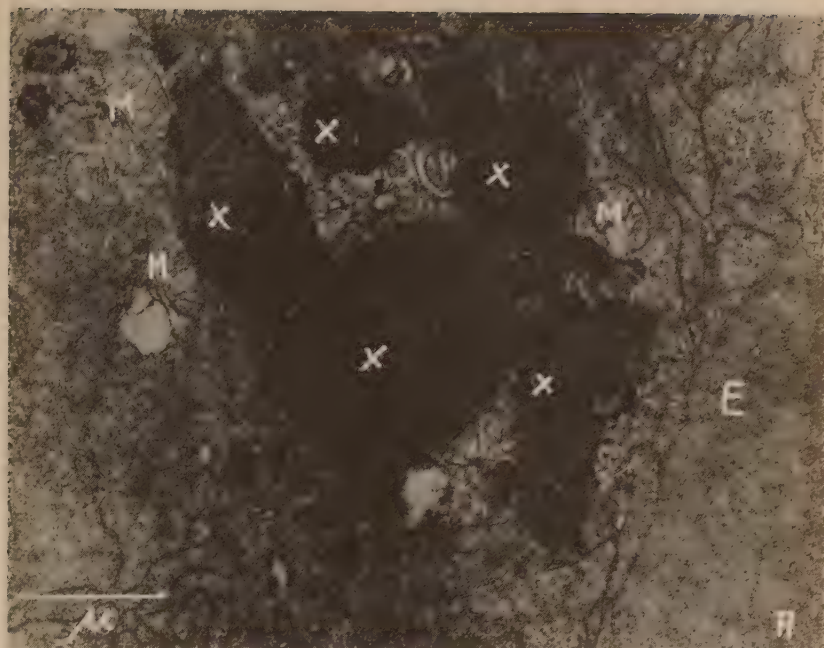


Abb. 6

=====

Ausschnitte der Milzhistiocyten

6 A: Zelleinschlüsse mit Erythrocytentrümmern und Enzymaktivität (1). Einschlüsse mit dichten Granula locker gepackt (2) oder eng gepackt (3) bei deutlichem Durchmesser der Granula von 50 - 60 Å (Ferritin) mit Enzymaktivität (X) und ohne Aktivität (S). Ferritingranula, abgebildet nach der Form eines Quadrates, befinden sich auch einzeln im Cytoplasma (o). Inkubiert bei p_H 5,3

Vergrößerung 1 : 132 000

Abb. 6 B

=====

Teil eines Zelleinschlusses. Dichte Granula von 50 - 60 Å Durchmesser, die jeweils bis zu vier feine Partikel als Untereinheiten erkennen lassen (entsprechend der Schnittführung durch das Oktaeder-Ferritin-Molekül).

Vergrößerung 1 : 216 000

Abb. 6 C

=====

Einschlüsse mit markanter saure Phosphataseaktivität und feingranulärem Eisen. Infrastrukturen der Bleiphosphat-Plaques (X) sind nicht auszumachen. Inkubation bei p_H 6,0

Vergrößerung 1 : 80 000

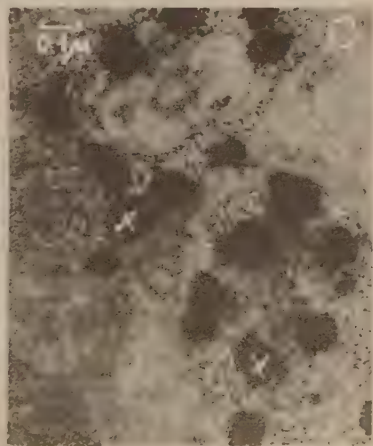
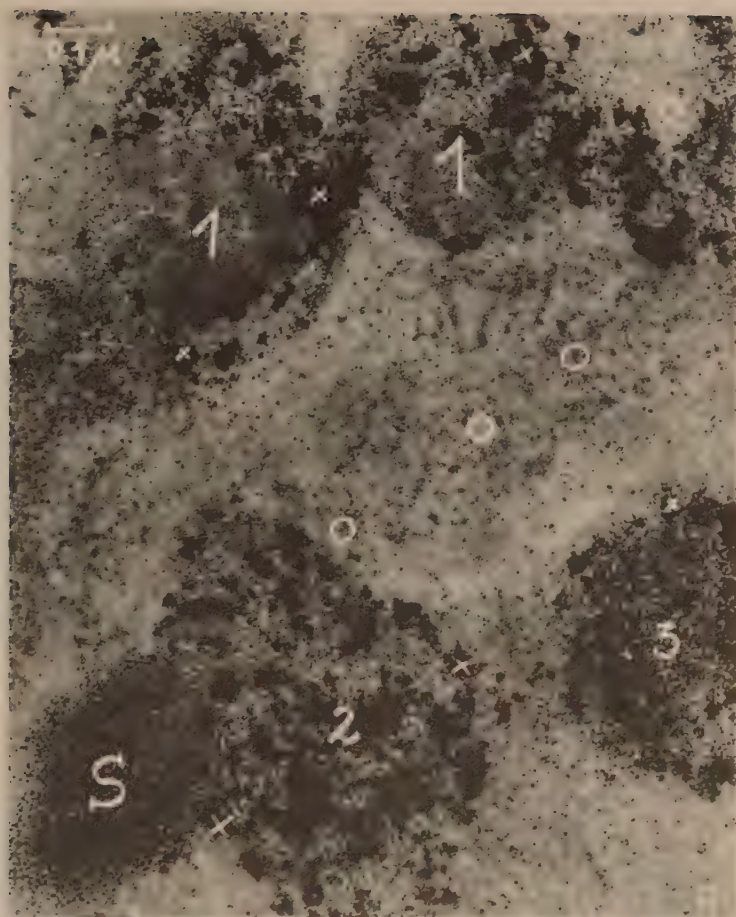


Abb. 7 A

=====

Cytoplasma eines Milzmakrophagen. Feingranuläres Eisen (o) in einem Einschuß mit starker Enzymaktivität (X). Daneben befindet sich ein deutlich membranbegrenzter Einschuß, angefüllt mit Ferritingranula (S) ohne Enzymaktivität. p_H -Wert des Inkubationsmedium 5,3

Vergrößerung 1 : 84 000

Abb. 7 B

=====

Drei unterschiedliche Einschlüsse in einem Milzhistiocyten: Locker gepackte Ferritinmoleküle (o) mit Enzymaktivität (1), dicht gepackte Ferritinmoleküle ohne Enzymaktivität (2) und ein eisenfreier Einschuß mit Enzymaktivität (3). Zahlreiche Ferritin-Granula (Q) im Cytoplasma gelegen. Inkubation bei p_H 5,3

Vergrößerung 1 : 132 000

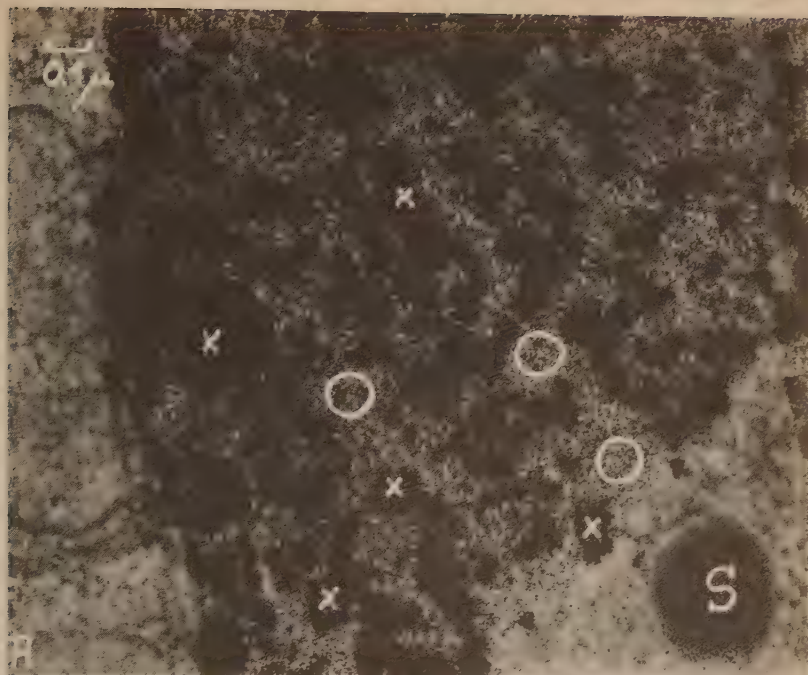


Abb. 8 A

=====

Bizarr geformter Einschuß in einem Milzmakrophagen, angefüllt mit feingranulärem Eisen (o) bei deutlicher Enzymaktivität (X). Inkubation bei p_H 5,3

Vergrößerung 1 : 48 000

Abb. 8 B

=====

Bizarr gestaltete Zelleinschlüsse, angefüllt mit feingranulärem Eisen (o) bei geringerer Enzymaktivität (X). Inkubiert bei einem p_H -Wert 6,0.

M = Mitochondrien

Vergrößerung 1 : 30 000

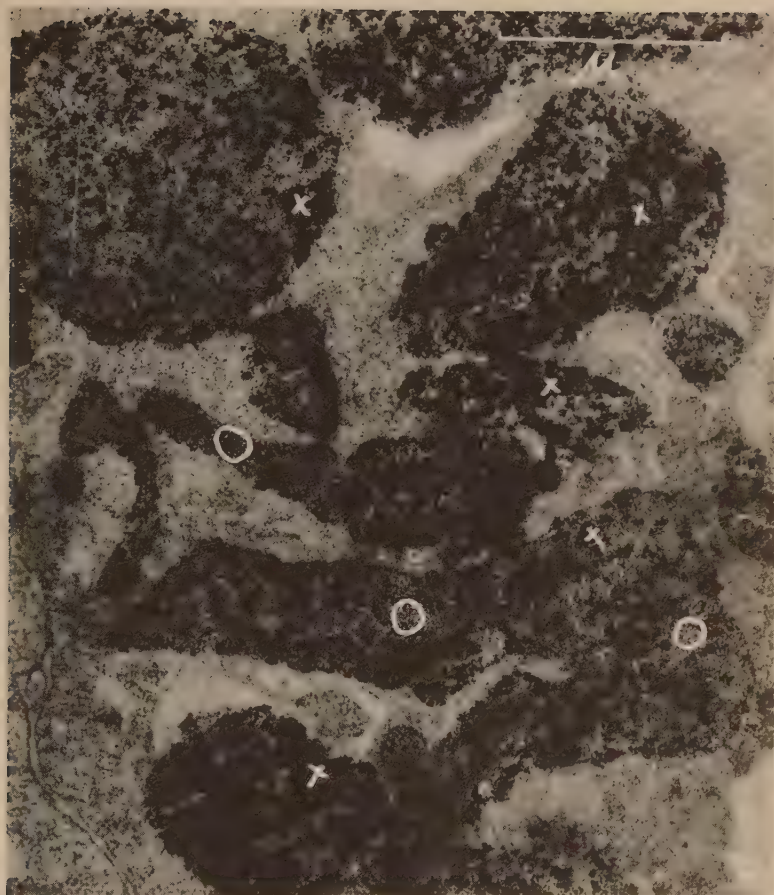


Abb. 9

=====

Cytoplasma-Ausschnitte der Milzhistiocyten

9 A: Feingranuläres Eisen in Einschlüssen, die nur teilweise enzymaktiv sind (X). Inkubation bei p_H 6,0

Vergrößerung 1 : 35 000

Abb. 9 B

=====

Einschlüsse mit feingranulärem Eiseninhalt zum Teil mit Enzymaktivität (X) und mit verdichteten Zonen ($\nearrow$). Inkubation bei p_H 6,0

Vergrößerung 1 : 35 000

Abb. 9 C

=====

Sehr kleine eisenhaltige Vakuolen, die teilweise enzymaktiv sind (X). Inkubiert bei p_H 5,3

Vergrößerung 1 : 72 000

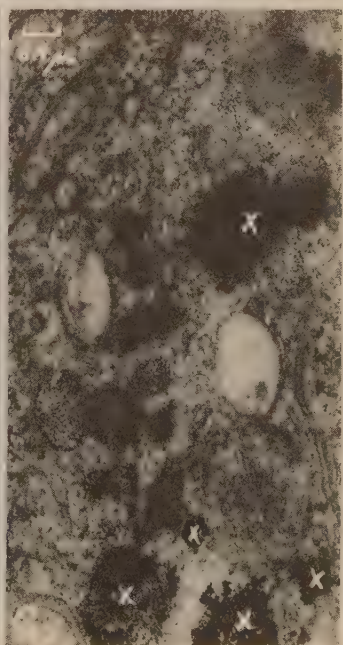
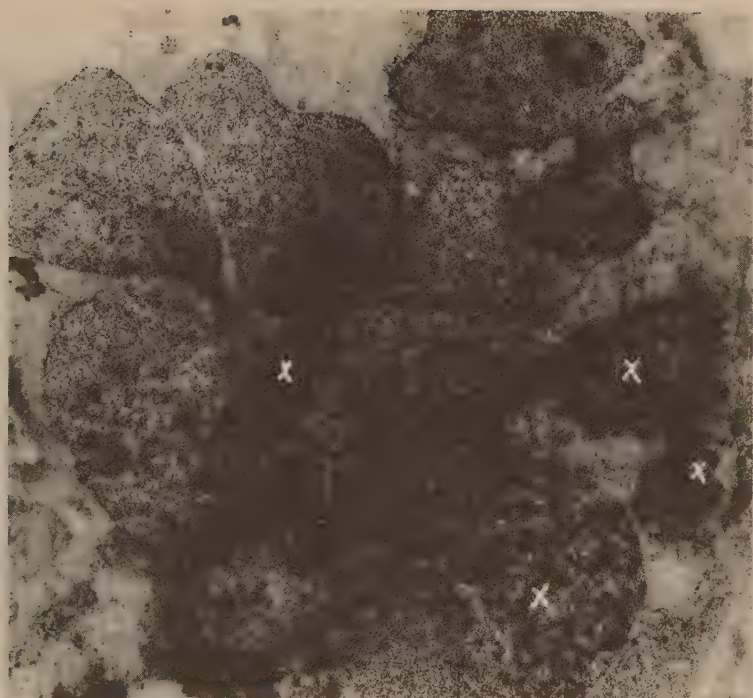


Abb. 10 A

=====

Übersichtsbild eines Histiocyten der Rattenmilz mit zahlreichen enzymaktiven, eisenfreien Einschlüssen (X) und einem intrazellulär gelegenen Erythrocyten (E). Enzymnachweis bei p_H 5,3

Vergrößerung 1 : 21 000

Inset: Eisenfreier Zelleinschluß mit peripherer Enzymaktivität (/), inkubiert bei p_H 5,3

Vergrößerung 1 : 88 000

Abb. 10 B

=====

Teil eines Makrophagen der Milz mit Einschlüssen, die vollständig (1) oder nur peripher (2) enzymaktiv sind; inkubiert bei p_H 5,3
M = Mitochondrien

Vergrößerung 1 : 49 000

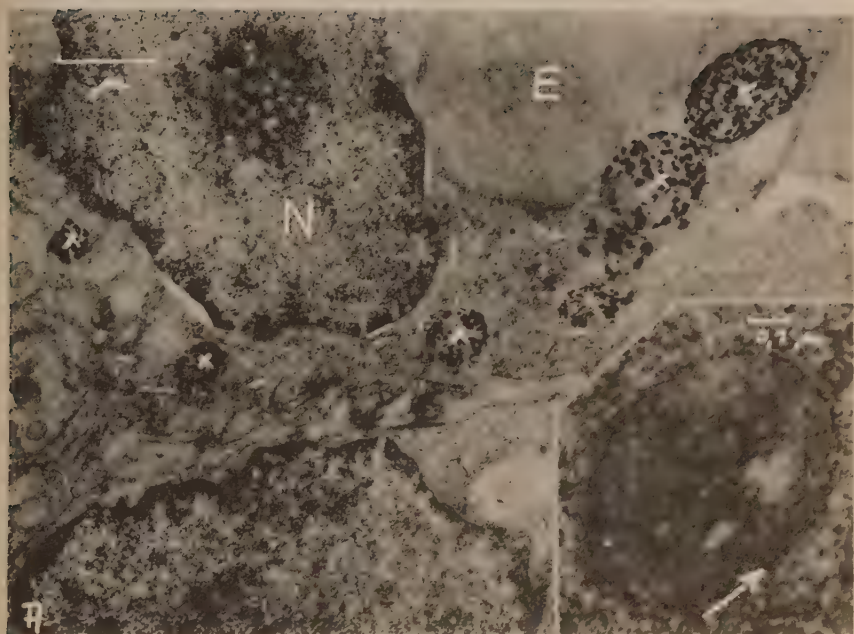


Abb. 11 A

=====

Cytoplasma eines Milzhistiocyten mit größerem, eisenfreien, stark enzymaktivem Einschuß (X). Daneben ein Zelleinschuß mit mehreren begrenzten, homogenen Zonen (1), Inkubation bei p_H 5,3

Vergrößerung 1 : 49 000

Abb. 11 B

=====

Golgi-Apparat eines Milzmakrophagen mit einzelnen enzymaktiven Hohlräumen und Bläschen (X). Außerdem Ferritinmoleküle frei im Cytoplasma und in einem Side-rosom (S) ohne Enzymaktivität; inkubiert bei p_H 5,3

Vergrößerung 1 : 72 000

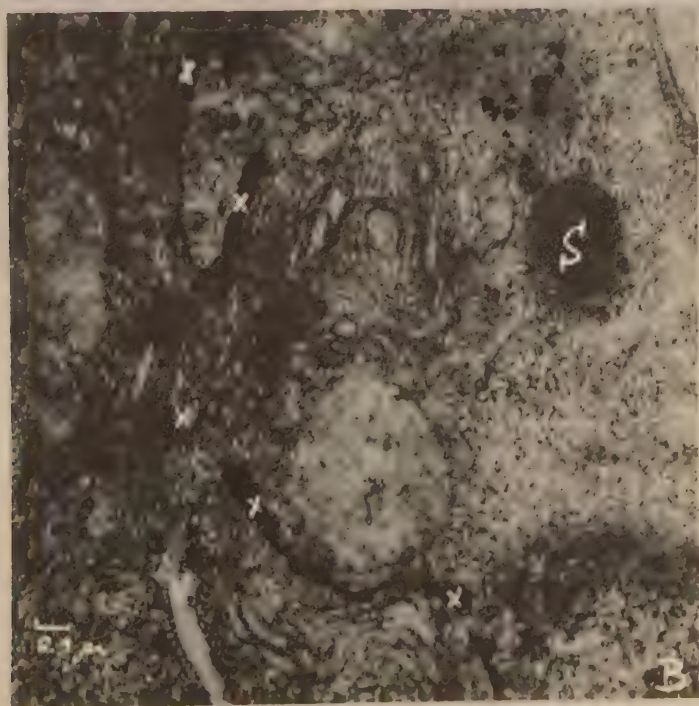
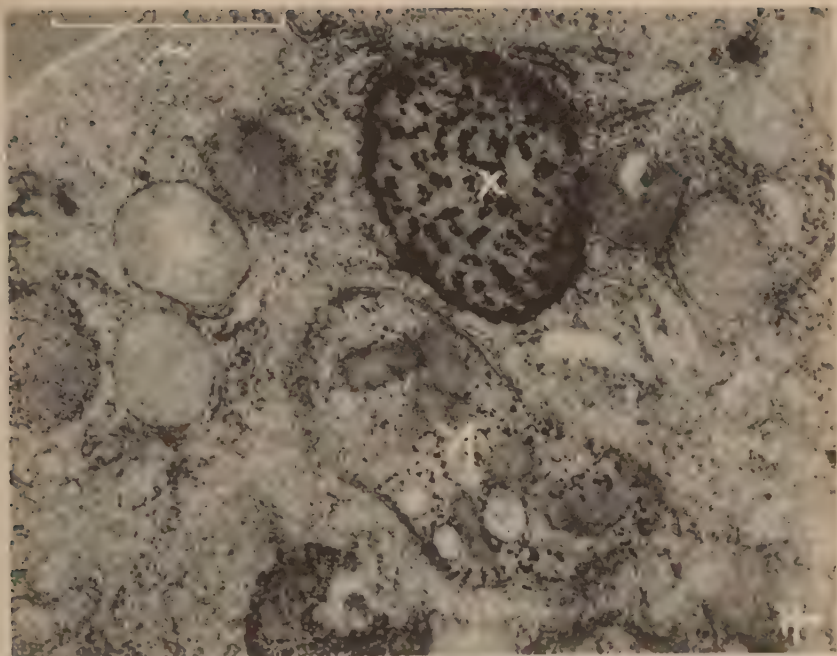


Abb. 12

=====

Zur Kontrolle der angewandten Methode für den Enzymnachweis im GOMORI-Medium Inkubation bei sauren und alkalischen p_H -Werten.

12 A: Nachweis der sauren Phosphatase bei p_H 5,3 im Hauptstückepithel der Rattenniere. Dunkle Plaques von Bleiphosphat als deutliches Zeichen einer Enzymaktivität (X) von membranbegrenzten Zellbestandteilen.
G = Golgi-Zone ohne Enzymaktivität (vergl. Abb. 11 B
Milzhistiocyt: Golgi-Apparat mit Enzymaktivität)
M = Mitochondrien

Vergrößerung 1 : 64 000

Abb. 12 B

=====

Das nach der GOMORI-Methode angewandte Substrat Na- β -Glycerophosphat wird ebenfalls bei neutralem und alkalischem p_H -Wert hydrolytisch gespalten.

12 B: Nachweis der Phosphatase bei p_H 7,5 im Hauptstück der Rattenniere. Enzymaktivität am Bürstensaum (B) und ebenfalls Enzymaktivität in Zelleinschlüssen (X).

Vergrößerung 1 : 35 000

12 C: Nachweis der Phosphatase bei alkalischem p_H -Wert 7,5 am quergeschnittenen Bürstensaum einer Hauptstückzelle der Rattenniere. (Auch bei neutralem und saurem p_H -Wert 5,0 findet man am Bürstensaum Enzymaktivität in geringerer Menge!)

Vergrößerung 1 : 56 000

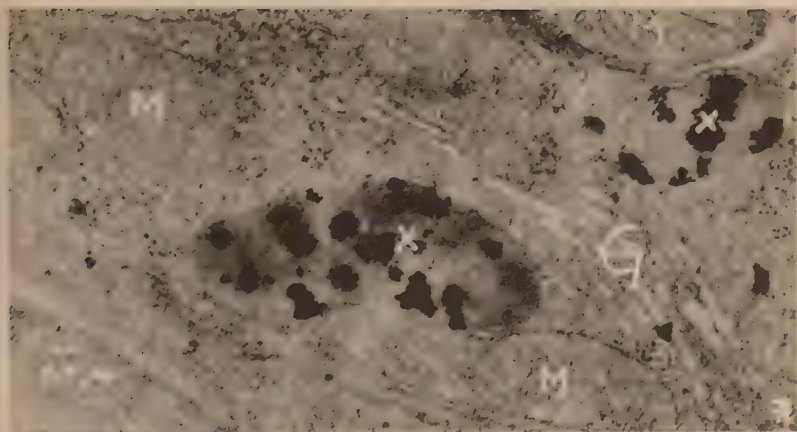


Abb. 13

=====

Zur Kontrolle der Lokalisation des lysosomalen Enzyms, saure Phosphatase, nach der angewandten Methode.

13 A: Nachweis der Phosphatase bei p_H 7,7 in den Leucocyten des Kaninchens in den Lungenkapillaren beim anaphylaktischen Schock. Deutliche, vorwiegend periphere Enzymaktivität der sog. Leucocyten-Granula (X).

N = Nucleus, AA = Antigen-Antikörper-Komplexe im Kapillarlumen, AE = Alveolar-Epithel, A = Alveolarraum, En = Endothel

Vergrößerung 1 : 54 000

Abb. 13 B

=====

Nachweis der Phosphatase bei p_H 7,4 im Jejunum der Ratte. Deutliche Lokalisation der Enzymaktivität an dem Bürstensaum (B) und an der Zellmembran (ZM).

Vergrößerung 1 : 24 000



Abb. 14

=====

Zur weiteren Kontrolle der Methodik (GOMORI 1952) kurze vergleichende Betrachtung enzymhaltiger Zeileinschlüsse verschiedener Organe bei saurem p_H -Wert des Inkubationsmedium.

14 A: Teil des Follikelepithels der Thyreoidea (Kaninchen) in einem aktiven Drüsenabschnitt.

1 = Vakuole mit homogenem, dichten Inhalt ohne Enzymaktivität nahe dem Ergastoplasma (eR); Vacuoleninhalt=Prosekret oder Kolloid? X = Vakuolen mit Enzymaktivität; außerdem reichlich freie Enzymaktivität (↗) im Cytoplasma zum Follikellumen hin (Sezernierung der lysosomalen Proteasen? oder Spaltung des Thyreoglobins im Cytoplasma nach Rückresorption?) Inkubiert bei p_H 6,0

Vergrößerung 1 : 42 000

14 B: Cytoplasma einer Nebennierenrindenzelle (Ratte).

M = Mitochondrien vom Tubulus-Typ; 1 = Vacuolen mit dichtem, homogenem Inhalt (Lipide bzw. Lipoproteide?) umgeben von deutlicher Enzymaktivität (↗).

X = Zelleinschluß von heller Matrix mit hoher Enzymaktivität. Inkubation bei p_H 5,0

Vergrößerung 1 : 64 000

14 C: Cytoplasma einer Granulosa-Luteinzelle am 8.-9. Graviditätstage der Ratte. M = Mitochondrien vom Tubulus-Typ; 1 = Vakuolen mit Lipid- bzw. Lipoproteid-Inhalt; X = Zelleinschluß von markanter Enzymaktivität und einigen dichten Tropfen (↗). Inkubation bei p_H 5,1 (hydrolytische Spaltung der Lipoproteide durch lysosomale Enzyme, hypophysär gesteuert als Start einer Steroidsynthese?)

Vergrößerung 1 : 42 000

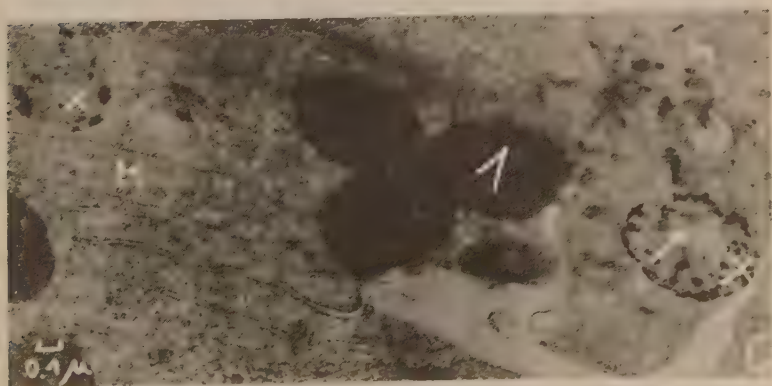
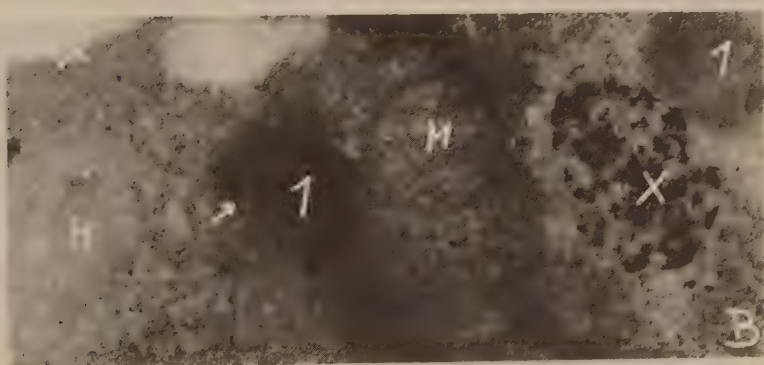
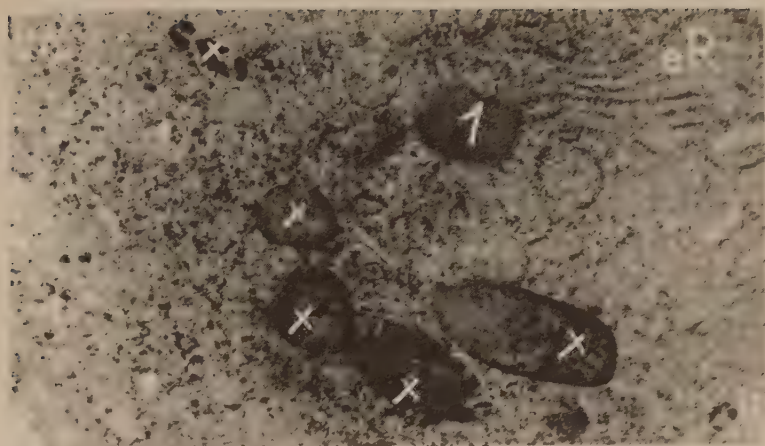


Abb. 15

=====

Zur Kontrolle des elektronenoptischen Nachweises einer lysosomalen Enzymaktivität Vergleich einiger phosphatasehaltiger Zelleinschlüsse.

15 A: Neuroglia des Großhirns 48 Stunden nach intracerebraler Stichverletzung (Kaninchen). X = Zellabschnitte mit deutlicher Enzymaktivität im dreidimensionalen Stützgewebe. (Bedeutung für den Stoffwechsel der Nervenzelle und bei pathologischen Veränderungen wie Entzündung und Phagocytose der Zelltrümmer?) In einigen Zellbereichen feine, dichte Granula ($\nearrow$), (feingranuläres Eisen?) Inkubation bei p_H 5,1

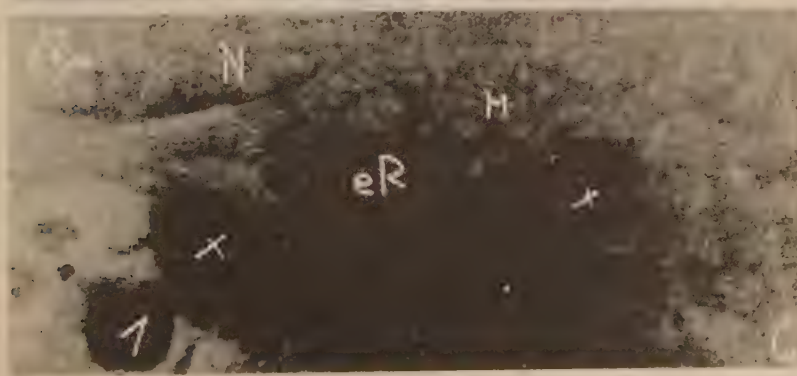
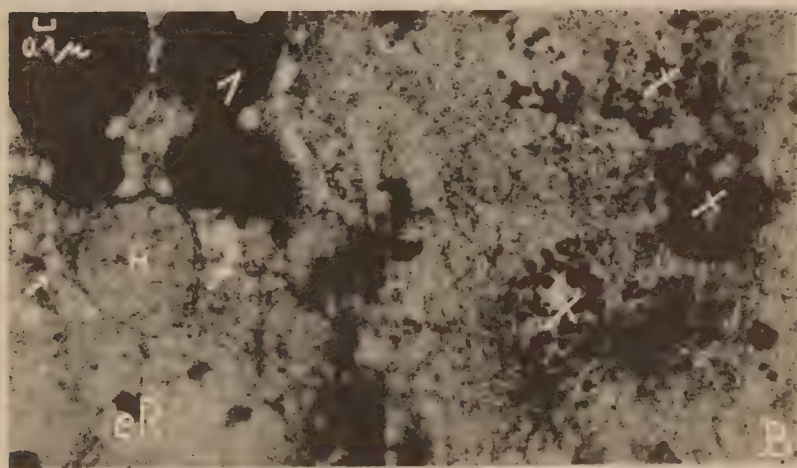
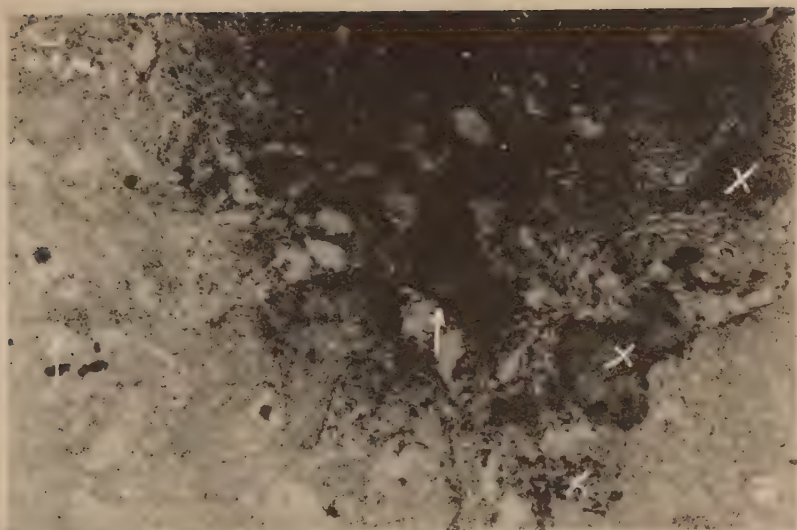
Vergrößerung 1 : 49 000

15 B: Cytoplasma-Ausschnitte zweier Pankreaszellen (Kaninchen). 1 = Lipoproteid-Vacuolen (Prosekret?) eR = Ergastoplasma; ($\nearrow$) = Negative der durch Glutaraldehyd herausgelösten Partikel (Glycogen?); X = Vakuolen mit hohem Enzymgehalt, inkubiert bei p_H 6,0

Vergrößerung 1 : 35 000

15 C: Teil eines aktiven Drüsenepithels der Prostata (Ratte). eR = zisternenartig ausgeweitetes Ergastoplasma, 1 = Prosekret? X = enzymreiche Vakuolen, M = Mitochondrien, N = Nucleus; Inkubation bei p_H 5,1

Vergrößerung 1 : 42 000



Für die Überlassung des Themas
sowie der jederzeit hilfreichen
Unterstützung schulde ich besonders
Herrn Professor Dr.med. W. Schwarz
und Herrn Dozent Dr.med. H.-J. Merker
herzlichen Dank.

Lebenslauf

Am 16. April 1940 wurde ich, Siegfried Spors, als Sohn des Tierarztes Dr.med.vet. Heinz Spors und seiner Gattin Alice, geb. Schubert, in Liegnitz geboren. Nach der Kapitulation des Deutschen Reiches wurden wir aus Schlesien ausgewiesen und zogen nach Eckernförde in Schleswig-Holstein. Hier besuchte ich von 1946 bis 1953 die Volksschule und ab 1953 das Domgymnasium in Schleswig (mathematisch-naturwissenschaftlicher Zweig). Im Frühjahr 1960 bestand ich die Reifeprüfung und begann im Sommersemester 1960 an der Freien Universität Berlin das veterinärmedizinische Studium. Für das Studienfach Medizin ließ ich mich im Juni 1960 inskribieren. Nach der naturwissenschaftlichen Vorprüfung wechselte ich zur Medizinischen Fakultät. Die ärztliche Vorprüfung bestand ich im Oktober 1962 mit dem Urteil "sehr gut". Die klinischen Vorlesungen hörte ich an der Universität Wien (SS.1963) und an der Freien Universität Berlin. Im Oktober 1966 beendete ich das medizinische Studium mit bestandenem Staatsexamen.

